

博士論文

フルタミドの活性に影響を与える酵素的・非酵素的反応についての
物理化学的研究

金沢大学大学院医薬保健学総合研究科

薬学専攻

活性相関物理化学研究室

学 籍 番 号 1228052007

氏 名 渡邊友里江

主任指導教員名 小田 彰史

目次

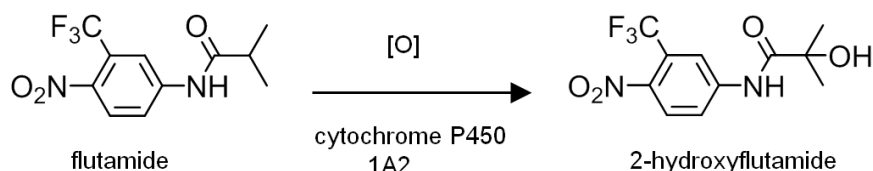
I. 序論.....	1
II. フルタミドの活性に影響を与える非酵素的反応の物理化学的研究.....	4
II-1. 芳香族ニトロ化合物の光反応について	4
II-2. フルタミドの光反応における溶媒効果の検討	6
II-2-1. 序	6
II-2-2. 方法	7
II-2-2-1. 試薬	7
II-2-2-2. 照射実験.....	8
II-2-2-3. 分析機器.....	8
II-2-2-4. 生成物の合成と同定	8
II-2-2-5. 内部照射実験.....	11
II-2-3. 結果と考察	12
II-2-3-1. アセトニトリル溶液中の光反応	12
II-2-3-2. 2-プロパノール溶液中の光反応	14
II-2-4. 結論	18
II-3. 2-ニトロベンゾフランと 3-メチル-2-ニトロベンゾフランの光反応の比較 検討.....	24
II-3-1. 序	24
II-3-2. 方法	25
II-3-2-1. 試薬	25
II-3-2-2. 分析機器.....	25
II-3-2-3. 合成と同定.....	26
II-3-2-4. 内部照射実験.....	27
II-3-2-5. 定性実験.....	28
II-3-2-6. X線結晶構造解析	29
II-3-3. 結果と考察	32
II-3-3-1. 2-ニトロベンゾフランに対する内部照射実験	32
II-3-3-2. 3-メチル-2-ニトロベンゾフランに対する内部照射実験	32
II-3-3-3. 2-ニトロベンゾフランの光反応における定性実験	34
II-3-3-4. 3-メチル-2-ニトロベンゾフランの光反応における定性実験	35
II-3-4. 結論	35

III. フルタミドの活性に影響を与える酵素的反応の物理化学的研究.....	41
III-1. 創薬におけるタンパク質計算化学の役割.....	41
III-1-1. in silico 創薬	41
III-1-2. タンパク質-医薬品化合物間の相互作用.....	41
III-1-3. Structure-Based Drug Design と Ligand-Based Drug Design	41
III-1-4. タンパク質の立体構造と機能.....	42
III-1-5. 分子動力学シミュレーションの歴史	43
III-1-6. 分子動力学計算の応用範囲.....	43
III-1-7. 分子動力学計算	44
III-1-7-1. ニュートンの運動方程式.....	44
III-1-7-2. 分子力場	45
III-1-7-3. 遠距離の静電相互作用の計算方法	48
III-1-7-4. 周期境界条件	48
III-1-7-5. Ewald 法	48
III-1-7-6. Particle Mesh Ewald 法	49
III-1-7-7. SHAKE.....	50
III-1-8. ドッキング	50
III-2. Cytochrome P450 とは	53
III-2-1. 薬物治療における CYP の遺伝子多型	53
III-2-2. CYP1A2 の遺伝子多型.....	53
III-2-3. CYP の構造	54
III-2-4. CYP の触媒サイクル.....	55
III-3. 分子動力学計算を用いた遺伝子変異型シトクロム P450 1A2 の三次構造及び構造柔軟性の予測	59
III-3-1. 序.....	59
III-3-2. 方法.....	60
III-3-3. 結果と考察.....	61
III-3-4. 結論.....	66
III-4. ドッキングと分子動力学シミュレーションを用いたシトクロム P450 1A2 の水分子が仲介する基質認識についての研究.....	76
III-4-1. 序.....	76
III-4-2. 方法.....	76

III-4-3. 結果と考察.....	77
III-4-4. 結論.....	83
III-5. 野生型と遺伝子変異型シトクロム P450 1A2 と 7-エトキシレゾルフィンとの複合体構造における基質認識様式の違いに関する検討.....	96
II-5-1. 序.....	96
II-5-2. 方法.....	97
II-5-3. 結果と考察.....	98
II-5-4. 結論.....	103
III-6. ドッキングによるシトクロム P450 1A2 とフルタミドの複合体構造の予測.....	115
II-6-1. 序.....	115
II-6-2. 方法.....	115
II-6-3. 結果と考察.....	115
II-6-4. 結論.....	116
IV. 総括.....	118
V. 謝辞.....	120
VI. 参考文献.....	121
VII. 論文目録.....	130

I. 序論

フルタミドは進行性の前立腺癌治療において広く用いられる医薬品化合物である [1-3] (Scheme)。前立腺癌の発症には、アンドロゲンの一種であるテストステロンが関与している。テストステロンは、 5α -レダクターゼによる代謝を受けてジヒドロテストステロンに変換されたのち、アンドロゲン受容体に結合して前立腺の細胞増殖を引き起こすことが知られている。フルタミドはプロドラッグであり、肝臓において代謝活性化を受けて水酸基が導入され、より活性の強い 2-ヒドロキシフルタミドとなる (Scheme I-1)。2-ヒドロキシフルタミドは、前立腺に存在するアンドロゲン受容体に結合することで、アンドロゲンの作用を競合的に阻害する。そのため、フルタミドの代謝活性化はその薬効を発揮する上で重要となるが、その主代謝酵素として機能しているのはシトクロム P450 1A2 (CYP1A2) であるとされる [4-5]。



Scheme I-1. Metabolic activation of flutamide catalyzed by CYP1A2.

フルタミドの臨床使用においては、いくつかの留意すべき問題点が存在する。一つ目の問題点として、フルタミドにより治療中の患者は、副作用として、光線過敏症を発症することが挙げられる [6-7]。光線過敏症とは、太陽光の暴露を受けた表皮が発赤、炎症、掻痒などの症状を起こす皮膚疾患である。光線過敏症発症のメカニズムは未だ解明に至っていない。しかし、フルタミド服用による光線過敏症の発症は、その光反応性に因果関係があると考えられ、*in vitro* で研究が行われている [8-12]。その先行研究においては、フルタミドの光反応はリン酸緩衝液にリポソームやウシ血清アルブミンなど超分子形成化合物を添加して、それにフルタミドを取り込ませることで、生体内環境を模した条件下、その光反応が検討されている [8-12]。彼らの研究結果からは、フルタミドは光照射によりニトロ-ニトリト転位を主反応として起こすことが示された。しかし、本来フルタミドを含む芳香族ニトロ化合物の光反応は、ニトロ-ニトリト転位以外にも光酸化還元や、光核置換、光脱離などの多様な光反応を示す化合物である [13-29]。そこで、第 II-2 節における研究では、アセトニトリルと 2-プロパノールの二種類の溶媒を用いてフルタミドの光反応性について比較検討を行った。

芳香族ニトロ化合物の光反応に関する初期の研究において、Chapman らは 9-ニトロアントラセンの光反応において、ニトロ-ニトリト転位が進行していることを報告して

いる [24]。彼らによれば、ニトロ-ニトリト転位の誘因は、芳香族ニトロ化合物のニトロ基と芳香環の二面角に関係があるとされている。Sortino らによるフルタミドの光反応性に関する研究においても、フルタミドは芳香環とニトロ基がなす二面角が同一平面上になくねじれているため、転位反応が進行しやすいのではないかと考えられている [8-11]。そこで、第 II-3 節においては、フルタミドと同じ芳香族ニトロ化合物の一つである 2-ニトロベンゾフランをモデルとしてその光反応性について検討を行った。ニトロ基と芳香環が同一平面に存在する 2-ニトロベンゾフランと 3-メチル-2-ニトロベンゾフランについて光反応を調べ、ニトロ基と芳香環が作る二面角と、ニトロ-ニトリト転位の関連性について調べた。

二つ目の問題点としては、フルタミドの代謝活性化を担う CYP1A2 には複数の遺伝子多型が存在するために、薬物の体内動態に個人差が生じることが挙げられる [30]。遺伝子変異型 CYP1A2 の中でも、転写領域に変異を持つ *CYP1A2*1C* [31]や *CYP1A2*1F* [32]などは十分な検討がなされており、CYP1A2 により代謝を受ける薬剤の臨床使用で、常に留意される存在となっている。一方で、エキソン領域に変異を持ち、アミノ酸変異を伴う変異体は、遺伝子頻度が低く *in vivo* での研究が困難であるとされる。さらに、これらアミノ酸置換を伴う変異体については、これまでに複数の研究グループがそれぞれの実験条件で検討を行っており、その酵素活性を厳密に比較することが難しかった [33-35]。しかし、第 III-3 節における研究の共同研究者である伊藤らによって、アミノ酸置換を伴う 20 種類の遺伝子変異型 CYP1A2 の酵素活性が、統一的な条件下で評価された [36]。一般に、タンパク質の機能は、その立体構造により発揮される。したがって、遺伝子変異型 CYP1A2 の酵素活性が変化した原因について理解するためには、まず CYP1A2 の構造特性について理解しなければならない。しかし、これまでにアミノ酸置換を伴う遺伝子変異型 CYP1A2 の立体構造は実験的に解明されておらず、その構造と活性の相関関係は明らかになっていない。第 III-3 節では、分子動力学 (Molecular Dynamics; MD) シミュレーションを用いて、複数の遺伝子変異型 CYP1A2 の立体構造を予測し、野生型との酵素活性の差異の原因について検討を行った。そのなかで、活性が著しく低下した 6 種類の変異体タンパク質 (CYP1A2.4, CYP1A2.6, CYP1A2.8, CYP1A2.11, CYP1A2.15, CYP1A2.16) と活性の上昇が確認された 1 種類の変異体タンパク質 (CYP1A2.14) において野生型に比べて酵素活性に差異が存在する原因を考察した。また、対照とするため、活性の変化がほとんどみられなかった変異体 (CYP1A2.13) についても同様の検討を行った。

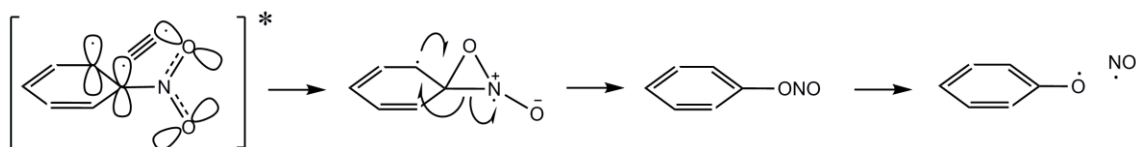
CYP1A2 の結晶構造 (PDBID: 2HI4) は阻害剤である α -ナフトフラボン (ANF) との複合体構造として 2007 年に報告されている [37]。その活性部位ポケットには一分子の結晶水が存在することが明らかになっている。CYP は、その活性中心であるヘムの第六配位子として水分子を利用しており、CYP1A2 以外の複数の分子種においてもその活性部位に結晶水を含んだ結晶構造が報告されている。CYP1A2 結晶構造の活性部位に存在する結晶

水は、CYP1A2 の I ヘリックスの Gly316 と、リガンドである α -ナフトフラボン (ANF) の間に水素結合を形成している可能性が示唆されている。本質的に、水分子は小さく可動性が高いために、実験的にその動きや働きを予測することが難しい。そのため、X 線結晶構造解析により得られた静的構造からは、動きのある水分子の働きを正確に予測することが困難であるとされる。そこで、第 III-4 節における研究では、MD シミュレーションを用いて、CYP1A2 と ANF 複合体構造の活性部位に存在する水分子の役割について検討を行った。さらに、基質である 7-エトキシレゾルフィン (7ER) との複合体構造をドッキングと MD シミュレーションにより作成し、CYP1A2 の基質認識をより詳細に検討した。基質である 7ER と阻害剤である ANF との複合体構造をそれぞれ予測することで、基質と阻害剤における構造的特性や基質認識における違いについて調べた。次に、第 III-5 節においては、遺伝子変異型 CYP1A2 に対しても 7ER を基質にドッキングと MD シミュレーションを行った。そこで、遺伝子変異型 CYP1A2 において、野生型と比較して活性に差異が見られた原因を、基質認識や複合体構造の比較から考察した。さらに、第 III-6 節においては、CYP1A2 とフルタミドとの複合体構造をドッキングにより予測し、代謝活性化のメカニズムを詳細に理解することを試みた。

II. フルタミドの活性に影響を与える非酵素的反応の物理化学的研究

II-1. 芳香族ニトロ化合物の光反応について

芳香族ニトロ化合物は、光求核置換反応や光酸化還元反応、光脱離、光誘起ニトロ-ニトリト転位といった多様な光反応を起こすことが知られている [13-29]。光求核置換や光酸化還元といった反応はこれまでに多くの検討が行われているが [13-23]、光脱離やニトロ-ニトリト転位は反応性が低く反応中間体の観測が困難であるという理由から、未だ詳細な理解がなされていない [24-29]。Chapman らにより提唱された、9-ニトロアントラセンの光反応において、ニトロ-ニトリト転位は光励起された後にニトロ基と芳香環の平面が垂直となることで引き起こされると考えられている [24]。Chapman らによる反応機構を Scheme II-1-1 に示す。



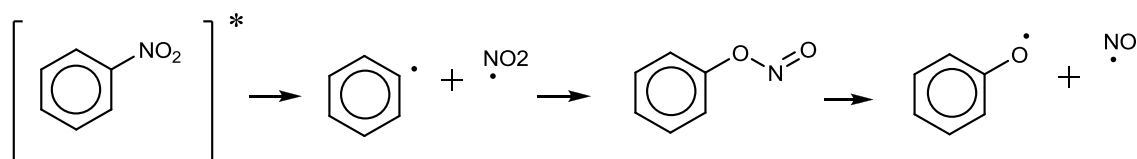
Scheme II-1-1. Reaction mechanism of nitro-nitrite rearrangement by Chapman *et al* [24].

このねじれた構造ではニトロ基と芳香環が脱共役しており、 $n\pi^*$ 励起状態を経由して反応が進行するとされる。Chapman らによる反応機構では、まず中間体であるオキサジリジン環が形成され、この三員環の O-N 結合が解裂することで、ニトリトが形成される。最終的には、ニトリトの解裂によりフェノキシラジカルと一酸化窒素ラジカルが生じる。9-ニトロアントラセンの光反応においては、最終的にアントラキノンが主生成物として形成され、一酸化窒素ラジカルは反応の系中に拡散するとされている。Chapman らの反応機構においては、中間体としてオキサジリジンやニトリト、フェノキシラジカルが形成される。ニトロ-ニトリト転位は、ニトロアントラセンの光反応に限らず [24-26]、メチル基やヒドロキシ基を導入したニトロアニソールにおいても進行することが報告されている [27]。

ニトロ-ニトリト転位の反応中間体の中でも、He らによりニトロベンゼンの気相中の光反応においてフェノキシラジカルが形成されることが実験的に確認されている [28]。しかし、Chapman らにより考えられているオキサジリジンやニトリトが実際に形成されているかどうかは、これまでに証明されていない。一般に、オキサジリジンやニトリトは反応性が高く、実験的にその存在を確認することが難しいとされている。

Lippert と Kelm も、4-フルオロニトロベンゼンの光反応においてニトロ基の転位反応が生じたことを報告している [29]。Lippert と Kelm によって提唱された反応機構を

Scheme II-1-2 に示す。



Scheme II-1-2. Reaction mechanism of the photoreaction of 4-fluoronitrobenzen proposed by Lippert and Kelm [29].

彼らの報告によれば、4-フルオロニトロベンゼンに対して、ベンゼン溶媒中で紫外光を照射すると、4-フルオロフェノール、4-フルオロニトロフェノール、4-フルオロビフェニルが生成する。この転位反応の反応機構は、前期解離により説明されている。まず、4-フルオロニトロベンゼンの C-N 結合が励起状態において解裂し、二酸化窒素ラジカルとフルオロフェニルラジカルを生じる。次に、二酸化窒素ラジカルの酸素原子がフルオロフェニルラジカルに再結合し、4-フルオロニトロソベンゼンが生成される。それから、4-フルオロニトロソベンゼンが解裂し、一酸化窒素ラジカルと 4-フルオロフェノキシラジカルが生じる。最終生成物としては、4-フルオロフェノキシラジカルが還元された場合には 4-フルオロフェノールが、4-フルオロフェノキシラジカルに一酸化窒素ラジカルが再結合し、溶媒中に含まれる酸素により酸化されると 4-フルオロニトロフェノールが形成される。4-フルオロビフェニルの生成については、フルオロフェニルラジカルが溶媒であるベンゼンと二量体化することで生じると考えられている。Lippert と Kelm は光反応生成物として 4-フルオロビフェニルが生じていることが、反応中間体としてフェニルラジカルが形成された証拠であるとしている。しかし、同じく反応中間体である 4-フルオロフェノキシラジカルが生成したことの証拠は示されていない。ラジカルは一般に反応性が高く、拡散により周囲の分子と容易に反応を起こしてしまう。そのため、二酸化窒素ラジカルが 4-フルオロフェニルラジカルに再結合して 4-フルオロニトロフェノールが生じた、という反応は容易には起こりにくい反応であると考えられる。

II-2. フルタミドの光反応における溶媒効果の検討

II-2-1. 序

フルタミドは前立腺癌治療薬として広く用いられている医薬品であり [1-3]、その副作用に光線過敏症を発症することが知られている [6-7]。光線過敏症との因果関係から、フルタミドの光反応性を理解するために様々な研究が行われている [8-12]。Sortino らによって、フルタミドを対象として、 β -シクロデキストリンのような包摂化合物やミセルのような超分子形成化合物を添加した不均一溶媒中における照射実験が行われている [8-11]。宇田川らもフルタミドの光反応について、超分子形成化合物と磁場効果を利用して研究を行っている [12]。彼らが行った照射実験は、リン酸緩衝液のような水溶液中で行われており、フルタミドを超分子形成化合物に取り込ませることで溶解させている。Sortino らも宇田川らも、フルタミドの不均一溶媒中の光反応は、光還元反応のみが進行すると主張している [10-12]。この光還元反応は、フルタミドと超分子形成化合物との間の水素引き抜きによる二分子反応により進行すると考えられている。さらに、宇田川らによる研究結果からは、フルタミドの光還元反応は励起三重項状態を経由して進行することが示唆されている。それに対し、宇田川らの研究結果においては、ニトロ-ニトリト転位は、超分子形成化合物を添加しなかったリン酸緩衝液中においてのみ観察されたことが報告されている [12]。Sortino らによる研究でも同様の結果が得られており、フルタミドのニトロ-ニトリト転位は、メタノールや 2-プロパノールのような均一溶媒中の照射実験においてしか進行しないことが報告されている [8]。宇田川らと Sortino らの研究結果では、均一溶媒中のフルタミドの光反応は、ニトロ-ニトリト転位が唯一の光反応として観察されたとしている。しかし、本来、芳香族ニトロ化合物の光反応はニトロ-ニトリト転位以外にも、光酸化還元、光求核置換、光脱離など多岐にわたるものである [13-29]。このような様々な光反応が、フルタミドの光反応において観察されるのかどうかはこれまでに検討されていない。フルタミドの光反応性について理解するためには、特に均一溶媒中における実験データが十分ではない。本節における研究では、先行研究において不均一な水溶液中で照射実験を行ったのとは対照的に、有機溶媒を用いた均一溶媒中で照射実験を行った。様々な種類の光反応が進行するように、反応性の高い溶媒を選択し、長時間の照射実験を行うこととした。

光反応性を持つ医薬品は複数知られており、日光の暴露により薬効を失うことが知られている [38]。このような医薬品の光分解は薬効の消失だけでなく、生体内において有害なフリーラジカルを生じさせることがある。光反応性のある医薬品が生体内でフリーラジカルを生じた場合には、その医薬品はハプテンとなり免疫原性を獲得し、光アレルギーを引き起こすと考えられている。ニトロ基同様、トリフルオロメチル基もまた光分解性のある官能基である。一般に、C-F 結合は結合が強く熱反応においては不活性で

あることが知られている。しかし、いくつかのベンゾトリフルオライド誘導体は光反応性が高く、光誘発性の加溶媒分解によりフッ素原子が容易に脱離することが報告されている [39–41]。フルオロベンゼンもまた光分解を起こし、フッ素原子を脱離させることが報告されている [42]。トリフルオロメチル基は強い電子吸引性を持ち、多くの医薬品の構造において存在する。フルタミドに限らず、その誘導体のビカルタミド、ランソプラゾール、エファビレンツなどに含まれる。これらの医薬品では、服用により光アレルギーが発症したという報告はないが、今後新しく開発される医薬品において光線過敏症のような光アレルギーが発症しないことが証明されているわけではない。フルタミドに含まれる、トリフルオロメチル基の光反応性を検討することは、今後の医薬品開発において有用な情報を与えること期待される。フルタミドの光線過敏症は頻度の低い副作用であるとされる。そのため、臨床研究において光線過敏症の原因物質を特定することは難しい。そこで本節における研究では、フルタミドの光感受性と光線過敏症の原因物質の特定を試みた。

先行研究においては、フルタミドの均一溶媒系での光反応は、メタノールや 2-プロパノール、リン酸緩衝液などを用いて検討されている [8,12]。それらの結果では、ニトロ-ニトリト転位が唯一の光反応として報告されている。それに対し、本節における研究ではフルタミドの溶解性が水よりも有機溶媒において高いことに着目し、アセトニトリルと 2-プロパノールを反応溶媒として用いた。2-プロパノールはプロトン性の極性溶媒であり、水素引き抜き反応における水素供与体となることが知られている。それに対し、アセトニトリルは非プロトン性の極性溶媒である。本研究は先行研究に比較して、反応性の溶媒を用い長時間の照射実験を行うことで、先行研究では確認されなかったフルタミドの光反応を確認することを目的とした。フルタミドの光反応性について検討を行うことは、生体内におけるフルタミドと光線過敏症の因果関係を予測することに役立つと期待される。

II-2-2. 方法

II-2-2-1. 試薬

フルタミドは東京化成株式会社から購入したものをそのまま使用した。フルタミドの試料溶液 ($1 \times 10^{-3} \text{ M}$) は、アセトニトリル (高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 等級、Nacalai Tesque) と 2-プロパノール (HPLC 等級、関東化学) を用いて調製した。2-プロパノール溶液については、 $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ の溶液も調製した。光反応生成物に取り込まれた水素原子が何に由来するのかを調べるため、重水素化されたアセトニトリルと 2-プロパノール溶液も調製した。また、product 4 と product 5 の関連を調べるため、product 4 の 2-プロパノール溶液 ($1 \times 10^{-3} \text{ M}$) を調製した。試料溶液中の溶存酸素は凍結融解法を三回繰り返すことで取り除き、その後試料溶液を封入した。

II-2-2-2. 照射実験

全ての照射実験は、光源に超高圧水銀灯 (UI-501C, ウシオ電機株式会社) を用い、UV-29 (Toshiba) と、赤外線を除くため蒸留水を満たした円筒型セルを通して照射を行った。

II-2-2-3. 分析機器

核磁気共鳴 (NMR) スペクトルは JOELECS-400 を用いて測定した。ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC-MS) には Hewlett-Packard HP6890/5793 MSD を利用した。赤外分光 (IR) スペクトルには JASCO FT/IR-400 を、吸収スペクトルには Hitachi U-2310 分光光度計を用いて測定した。X 線結晶構造解析には Mo $K\alpha$ 光源 ($\lambda = 0.7107 \text{ \AA}$) を用いて Rigaku RAXIS-RAPID を利用した。

II-2-2-4. 生成物の合成と同定

光生成物の同定は、GC-MS の保持時間とフラグメントパターンを標品となる化合物と比較することで行った。product 3~6 は標品を合成し、NMR と GC-MS によりその化学構造を決定した (Figure II-2-2-4-1)。product 2 については、試料溶液から直接単離し、NMR、GC-MS、IR、X 線結晶構造解析により構造を決定した。

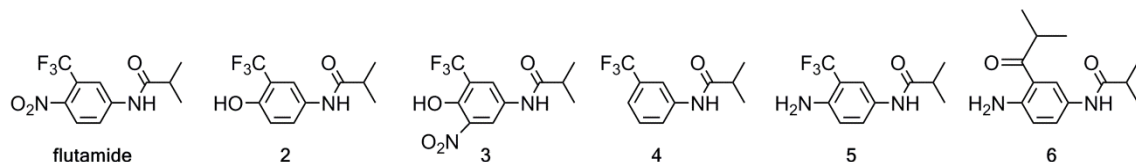


Figure II-2-2-4-1. Chemical structures of flutamide and the photoproducts.

2-Methyl-N-[4-hydroxy(3-trifluoromethyl)phenyl]propanamide (product 1) の合成

Product 1 は過去に報告されている合成方法 [12] を参考に、次の三段階の合成方法により合成した。

4-Nitro-2-(trifluoromethyl)phenol の合成

4-Nitro-2-(trifluoromethyl)aniline (502 mg, 2.43 mmol) を濃硫酸 2.5 mL に混合させ、ここに亜硝酸ナトリウム (190 mg, 0.36 mmol) を濃硫酸 1.3 mL に溶解させたものを徐々に滴下した。室温で一時間反応させた後、反応液を氷水に注ぎ込み、5 分間激しく攪拌させた。油浴上で徐々に温度を上げて、約 100 °C で 1 時間反応させた。室温に戻した後、アンモニア水で中和し酢酸エチルで抽出した。これを無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、エバポレーターで溶媒を留去させた。残留物をカラムクロマトグラフィー (SiO_2 ; 3:7 EtOAc/hexane) で精製したとこ

ろ、オレンジ色の結晶が 46.5 mg 得られた。(0.225 mmol, 9 %)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3Cl) δ : 8.49 (1H, d, $J = 2.6$ Hz), 8.34 (1H, dd, $J = 2.7, 7.9$ Hz), 7.26 (1H, brs), 7.09 (1H, d, $J = 9.0$ Hz).

4-Amino-2-(trifluoromethyl)phenol の合成

4-Nitro-2-(trifluoromethyl)phenol 25 mg (0.12 mmol) と塩化アンモニウム 50 mg (0.94 mmol) をメタノール:水 = 1:1 の混液で溶解させた。そこに、亜鉛末 933 mg (14.3 mmol) を加えて約 1 時間撹拌させた。反応液を濾過し、熱湯で洗浄した。残留物を酢酸エチルで抽出し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。これをエバポレーターで溶媒を留去させたところ、精製処理を行うことなく、薄いオレンジ色の結晶が 18.2 mg 得られた。(0.10 mmol, 85%)

2-Methyl-N-[4-hydroxy(3-trifluoromethyl)phenyl]propaneamide の合成

4-Amino-2-(trifluoromethyl)phenol 5.7 mg (32.2 μmol) をピリジンに溶解させ、ここにイソ酪酸塩化物 (177 μmol , 27.5 μL) を滴下して室温で 19 時間反応させた。反応液を酢酸エチルで抽出し、硫酸銅水溶液でピリジンを除去した。濃縮後、残留物 9.9 mg をカラムクロマトグラフィー (SiO_2 ; 4:6 EtOAc/hexane) で精製したところほぼ純粋な目的の生成物が、白い結晶として得られた。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.72 (1H, d, $J = 2.7$ Hz), 7.54 (1H, dd, $J = 2.7, 8.8$ Hz), 6.88 (1H, d, $J = 8.8$ Hz), 2.59 (1H, sep, $J = 6.8$ Hz), 1.09 (6 H, d, $J = 6.8$ Hz). MS (EI) m/z 247 (M^+), 228 ($\text{M}^+ - \text{F}$), 177 ($\text{MH}^+ - \text{COCH}(\text{CH}_3)_2$, base peak), 71 ($(\text{CH}_3)_2\text{CHCO}^+$), 43 ($(\text{CH}_3)_2\text{CH}^+$)

2-Methyl-N-[3-(trifluoromethyl)phenyl]propaneamide (product 3) の合成

3-Aminobenzotrifluoride (0.06 mL, 0.5 mmol) をピリジン溶媒に溶かし、2-methylpropane chloride (0.08 mL, 0.75 mmol) を滴下して撹拌させた。1 時間後、2-methylpropane chloride (0.08 mL, 0.75 mmol) を追加で滴下し、さらに 1 時間撹拌させた。反応後、ピリジン溶媒は硫酸銅水溶液で取り除いて、分液処理を行い、有機相を酢酸エチルで抽出した。有機相は硫酸ナトリウムを用いて乾燥させ、エバポレーターにより濃縮させた。カラムクロマトグラフィー (SiO_2 ; 2:8 EtOAc/hexane) により生成したのち、最終生成物を無色透明な結晶 (85 mg, 73%) として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3Cl) δ : 7.85 (1H, s), 7.72 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 7.65 (1H, brs), 7.35 (2H, m). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3Cl) δ : 176.60, 138.56, 130.97 (q, $J = 32$ Hz), 129.15, 123.7 (q, $J = 271$ Hz), 123.21, 120.50 (q, $J = 4$ Hz), 116.88 (q, $J = 4$ Hz), 36.18, 19.23. IR (KBr) cm^{-1} : 3252, 1664, 1448, 1337. MS (EI) m/z 231 (M^+), 212 ($\text{M}^+ - \text{F}$), 188 ($\text{M}^+ - \text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 161 ($\text{MH}^+ - \text{COCH}(\text{CH}_3)_2$, base peak), 71 ($(\text{CH}_3)_2\text{CHCO}^+$), 43 ($(\text{CH}_3)_2\text{CH}^+$).

***N*-[4-amino-3-(trifluoromethyl)phenyl]2-methylpropaneamide (product 4) の合成**

フルタミド (0.996 g, 0.36 mmol) と塩化アンモニウム (1.079 g, 20.2 mmol) を 46 mL のメタノールに溶解させ、粉末銅 (3.56 g, 54.6 mmol) を加え室温で 1 時間攪拌した。攪拌後、濾過して温水で洗い、酢酸エチルで抽出した。抽出した有機相を無水硫酸ナトリウムで乾燥させエバポレーターで濃縮した。その後、精製処理をすることなく目的とする生成物を茶色の結晶 (0.896 g, 100%) として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3Cl) δ : 7.71 (1H, brs), 7.53 (1H, d, $J = 2.3$ Hz), 7.41 (1H, dd, $J = 2.3, 8.6$ Hz), 6.65 (1H, d, $J = 8.6$ Hz), 2.49 (1H, sep, $J = 6.9$ Hz), 1.20 (6H, d, $J = 6.9$ Hz). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3Cl) δ : 175.88, 141.22, 128.25, 126.12, 124.40 (q, $J = 271$ Hz), 118.18 (q, $J = 5$ Hz), 117.48, 113.51 (q, $J = 30$ Hz), 36.01, 19.36. IR (KBr) cm^{-1} : 3403, 3273, 1633, 1509, 1102. MS (EI) m/z 246 (M^+), 227 ($\text{M}^+ - \text{F}$), 176 ($\text{MH}^+ - \text{COCH}(\text{CH}_3)_2$, base peak), 71 ($(\text{CH}_3)_2\text{CHCO}^+$), 43 ($(\text{CH}_3)_2\text{CH}^+$).

1-Methylethyl-2-amino-4-(2-methylpropanamido)benzoate (product 5) の合成

Product 5 に相当する標品は次の三段階の合成方法により合成した。

4-(2-Methylpropanamido)-2-nitrobenzoic acid の合成

ピリジン溶媒中で、5-amino-2-nitrobenzoic acid (1.01 g, 5.55 mmol) に 2-methylpropanoyl chloride (0.70 μL , 6.7 mmol) を滴下し、24 時間攪拌させた。ピリジンを硫酸銅水溶液で除去し、酢酸エチルで抽出した。抽出物から溶媒をエバポレーターで除いたあと、カラムクロマトグラフィーにて精製を試みたが、目的の生成物を不純物から完全に分離することができなかったため、未生成物の状態で次の反応に利用した。

1-Methylethyl 2-nitro-4-(2-methylpropanamido)benzoate の合成

15 mL のジメチルホルムアミドに、4-(2-methylpropanamido)-2-nitrobenzoic acid (1.73 g) の未精製物、1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (2.63 g, 13.7 mmol)、*N,N'*-dimethyl-4-aminopyridine (1.67 g, 13.7 mmol) を溶解させ、2-プロパノール (1.6 mL, 21 mmol) を徐々に滴下した。反応液を 24 時間攪拌した後、酢酸エチルで抽出した。抽出物は無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥させ、真空条件下エバポレーターで濃縮させた。カラムクロマトグラフィー (SiO_2 ; 4:6 EtOAc/hexane) で精製し、目的とする生成物を茶色の固体 (739 mg, 45%) として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3Cl) δ : 8.30 (1H, brs), 7.94 (1H, d, $J = 8.8$ Hz), 7.83 (1H, dd, $J = 2.0, 8.8$ Hz), 7.79 (1H, d, $J = 2.0$ Hz), 5.22 (1H, sep, $J = 6.4$ Hz), 2.53 (1H, sep, J

= 6.8 Hz), 1.31 (6H, d, $J = 6.4$ Hz), 1.19 (6H, d, $J = 6.8$ Hz). ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3Cl) δ : 176.18, 165.87, 143.23, 141.40, 130.53, 125.62, 120.28, 118.76, 70.70, 36.49, 21.20, 19.18. MS (EI) m/z 294 (M^+), 224 ($\text{MH}^+ - \text{COCH}(\text{CH}_3)_2$, base peak), 71 ($(\text{CH}_3)_2\text{CHCO}^+$), 43 ($(\text{CH}_3)_2\text{CH}^+$).

1-Methylethyl 2-amino-4-(2-methylpropanamido)benzoate の合成

1-Methylethyl-2-nitro-4-(2-methylpropanamido)benzoate (739 mg, 2.5 mmol) と塩化アンモニウム (1.038 g, 19.0 mmol) をメタノールに溶解させて粉末銅 (1.65 g, 25 mmol) を加え、室温で 19 時間攪拌させた。反応液を酢酸エチルで抽出し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた後エバポレーターで濃縮させた。カラムクロマトグラフィー (SiO_2 ; 4:6 EtOAc/hexane) により精製し、目的とするアミンを茶色の固体 (428.5 mg, 65%) として得た。

^1H -NMR (400 MHz, CD_3Cl) δ : 7.79 (1H, d, $J = 2.6$ Hz), 7.58 (1H, dd, $J = 2.6, 8.6$ Hz), 6.97 (1H, brs), 6.65 (1H, d, $J = 8.8$ Hz), 5.66 (1H, brs), 5.22 (1H, sep, $J = 6.2$ Hz), 2.48 (1H, sep, $J = 6.9$ Hz), 1.37 (6H, d, $J = 6.2$ Hz), 1.20 (6H, d, $J = 6.9$ Hz). ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3Cl) δ : 175.27, 167.12, 147.36, 127.94, 127.07, 122.81, 116.98, 110.92, 67.72, 36.09, 21.81, 19.50. IR (KBr) cm^{-1} : 3363, 3290, 1656, 1574, 1239. MS (EI) m/z 264 (M^+), 221 ($\text{M}^+ - \text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 152 ($\text{MH}^+ - \text{COCH}(\text{CH}_3)_2$, base peak).

II-2-2-5. 内部照射実験

N-[4-hydroxy 3-nitro-5-(trifluoromethyl)phenyl]2-methylpropaneamide (product 2) の単離

フルタミドのアセトニトリル溶液 (1.8×10^{-3} M, 200 mL) を凍結溶解法による処理をせずに、高圧水銀灯 (UVL-100HA-100P; Riko) を光源として光反応器にて照射実験を行った。照射後の反応液から、光生成物を酢酸エチルにより抽出し、カラムクロマトグラフィー (SiO_2 ; 2:8 EtOAc/hexane) を用いて精製したところ、目的の生成物である product 2 が濃い黄色の固体として得られた (42 mg, 41 %).

^1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 10.96 (1H, s), 8.60 (1H, d, $J = 2.8$ Hz), 8.10 (1H, d, $J = 2.8$ Hz), 7.82 (1H, s), 2.58 (1 H, sep, $J = 6.8$ Hz) 1.27 (6 H, d, $J = 6.8$ Hz). ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 178.64, 149.52, 135.50, 132.06, 127.18 (q, $J = 5$ Hz), 123.66 (q, $J = 271$ Hz), 121.60 (q, $J = 31$ Hz), 119.76, 36.98, 19.67. IR (KBr) cm^{-1} : 3301, 1671, 1538, 1146. HRMS (FAB^+) m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ found: 293.0746, calc: 293.0744. MS (EI) m/z 292 (M^+), 273 ($\text{M}^+ - \text{F}$), 222 ($\text{MH}^+ - \text{COCH}(\text{CH}_3)_2$, base peak), 71 ($(\text{CH}_3)_2\text{CHCO}^+$), 43 ($(\text{CH}_3)_2\text{CH}^+$).

Table II-2-1 に product 2 の結晶構造と実験条件のデータを、Figure II-2-1 にオルテップ図を示す。

Table II-2-1. Crystal and experimental data of product **2**.

Chemical formula: $C_{11}H_{11}F_3N_2O_4$
Formula weight = 292.22
T = 296 K
Crystal system: monoclinic
Space group: $P2_1/c$ Z = 4
a = 4.9578(4) Å
b = 12.2784(12) Å
c = 21.4038(19) Å
 $\beta = 93.308(2)^\circ$
V = 1300.8(2) Å³
 $D_x = 1.492 \text{ g/cm}^3$
Radiation: Mo K α ($\lambda = 0.7107 \text{ \AA}$)
 $F(0\ 0\ 0) = 600.00$
No. of reflections collected = 12350
No. of independent reflections = 2981
 θ range for data collection: 3.31 to 27.48 °
Data/Restraints/Parameters = 2981/0/191
Goodness-of-fit on $F^2 = 1.105$
R indices [$I > 2\sigma(I)$]: R1 = 0.0604, wR2 = 0.1761
R indices (all data): R1 = 0.0743, wR2 = 0.1866
 $(\Delta/\sigma)_{\max} = 0.000$
 $(\Delta\rho)_{\max} = 0.321 \text{ e\AA}^{-3}$
 $(\Delta\rho)_{\min} = -0.214 \text{ e\AA}^{-3}$
Measurement: Rigaku RAXIS-RAPID.
Program system: Yadokari-XG
Structure determination: SHELXL-97
Refinement: full-matrix least-squares on F^2
CCDC deposition number: 945250

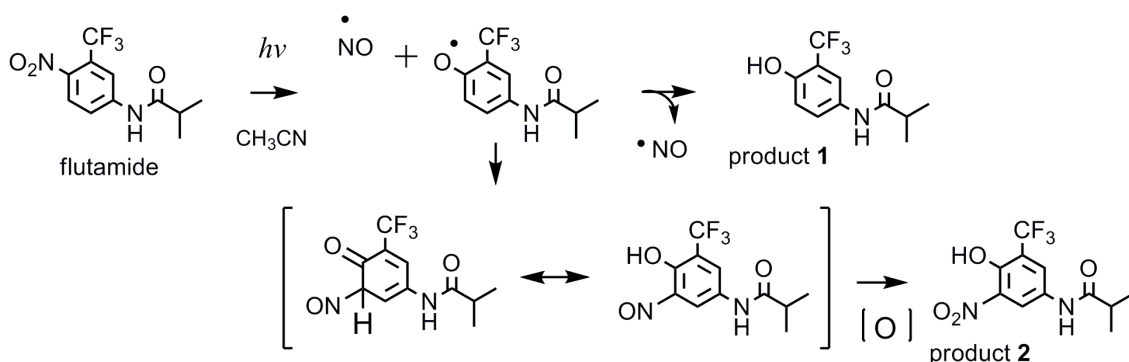
II-2-3. 結果と考察

II-2-3-1. アセトニトリル溶液中の光反応

フルタミドのアセトニトリル溶液中における吸収スペクトルの経時変化を Figure II-2-2 に示す。溶存酸素存在下、溶存酸素非存在下の経時変化をそれぞれ Figure II-2-2 (a)、Figure II-2-2 (b) に示している。溶存酸素存在下の吸収スペクトルには複数の等吸収点が見られ、はっきりと存在している。このことから、溶存酸素が存在する条件下では、単一の光反

応が進行していることが予想された。さらに、二つの吸収スペクトルでは、その経時変化の度合いが大きく異なっているため、溶存酸素がある場合とない場合では、異なる光反応が進行していることが考えられた。参考のため光反応生成物の吸収スペクトルを Figure II-2-3 に示す。

溶存酸素存在下のアセトニトリル溶液において、光反応生成物は **product 1** および **product 2** であることがわかった。このうち、主生成物となるのは **product 2** である。この結果から、溶存酸素が存在する条件下ではニトロ-ニトリト転位反応が優先的に進行すると予想された。それに対し、溶存酸素が存在しない場合のアセトニトリル溶液では、光反応生成物として **product 1**、**product 3**、**product 4** が確認され、**product 2** の生成は確認することができなかった。このことから **product 2** は反応溶液が酸素を含んでいる条件でなければ生成しないことが示唆された。予想される **product 2** の反応機構を Scheme II-2-1 に示す。



Scheme II-2-1. Proposed reaction mechanism for the photogeneration of **product 2** in aerated acetonitrile solution.

予想された反応機構では、まず始めにニトロ-ニトリト転位が起こり、フェノキシラジカルと一酸化窒素ラジカルが生じる。続いて、一酸化窒素ラジカルがフェノキシラジカルの *ortho* 位に再結合し、溶存酸素により酸化されることで **product 2** が生成する。**Product 1** の生成においては、一酸化窒素ラジカルは散逸し反応に関与しないことが予想された。**Product 1** は、フェノキシラジカルが水素原子を反応の系中から引き抜いた結果生じると予想される。アセトニトリル溶液中の水素供与体としては、溶質であるフルタミド、溶媒であるアセトニトリルが考えられる。加えて、アセトニトリルが高い吸湿性を持つため、溶媒に混入した水が光反応として関与した可能性が考えられた。

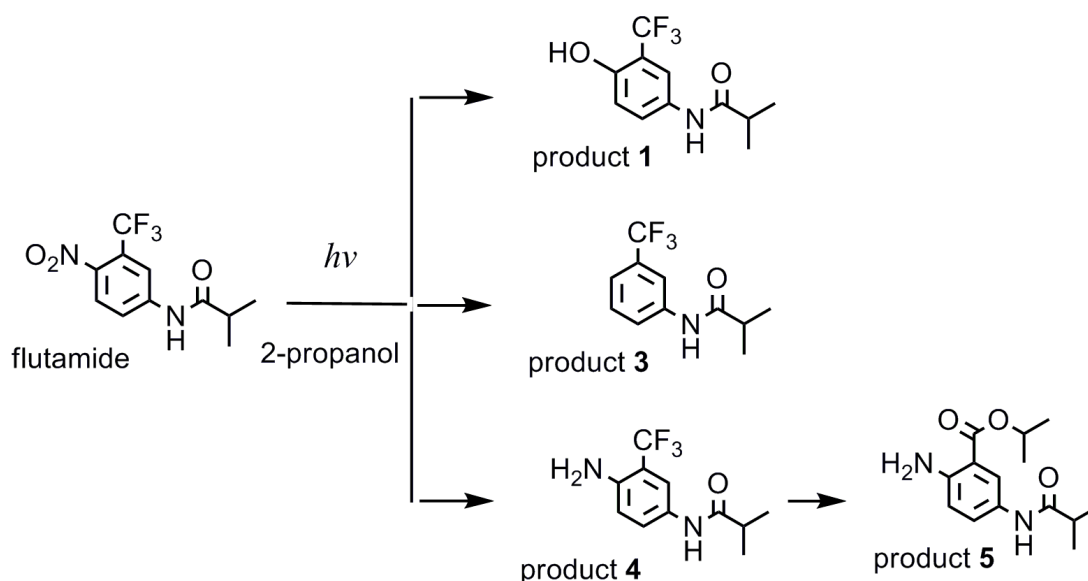
Product 1 の水素原子が何に由来するのかを調べるために、重水素化アセトニトリルを用いて照射実験を行った。もし、アセトニトリルが水素供与体として働くなら、ヒドロキシル基に重水素が導入された **product 1** が生じるはずである。しかし、この照射実験のあとに、フルタミドから生じた **product 1** と **product 2** を GC-MS で分析した結果、重

水素が導入されていないことがわかった。仮に、過剰量の水が重水素化アセトニトリルに混入していたとしても、フェノールの重水素と軽水素は交換するので、GC-MS ではフェニル-OH とフェニル-OD の同位体ピークが観察されるはずである。GC-MS の結果では、フェニル-OD による同位体ピークは観察されなかったので、重水素と軽水素が交換していないと考えられる。以上から、product 1 のヒドロキシル基の水素原子は、アセトニトリル由来ではなく、アセトニトリル溶媒に混入した水を水素供与体として生成したと考えられる。

II-2-3-2.2-プロパノール溶液中の光反応

2-プロパノール溶液中のフルタミドの吸収スペクトルの経時変化を Figure II-2-4 に示す。溶存酸素存在下と、溶存酸素非存在下におけるそれぞれの経時変化を Figure II-2-4 (a)、Figure II-2-4 (b) に示している。2-プロパノール溶液における吸収スペクトルではどちらも等吸収点が見られないことから、その光反応は単反応ではなく、複数の光反応が関与していることが考えられる。この結果からフルタミド以外の物質がその光反応に関与している可能性が示唆された。さらに、吸収スペクトルの経時変化は、溶存酸素が存在しない場合の方が、光反応の進行が早いことを暗に示唆された。

溶存酸素非存在下のフルタミドの 2-プロパノール溶液においては、4 種類の光反応生成物が生じていることがわかった。Scheme II-2-2 に示すように、溶存酸素非存在下の 2-プロパノール溶液では、ニトロ-ニトリト転位由来の生成物 (product 1)、光脱離生成物 (product 3)、光還元反応由来の生成物 (product 4, 5) が確認された。

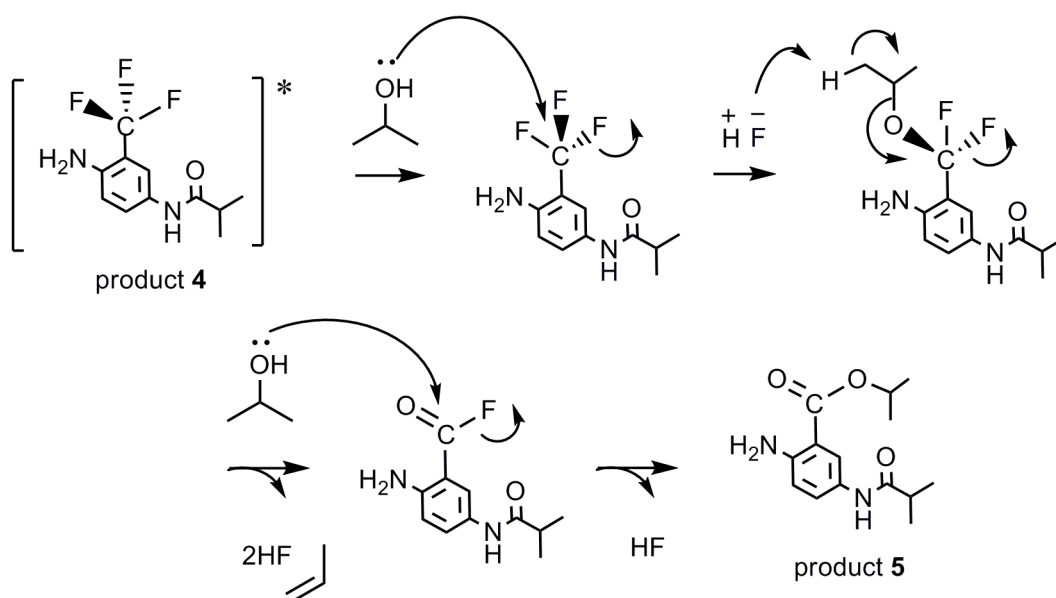


Scheme II-2-2. Photoproducts in 2-propanol solution of flutamide.

2-プロパノール溶液中の溶存酸素存在下では、アセトニトリル溶液中の光反応と同じ生成物が存在した。ここで、**product 5** の生成においてはフルタミドからフッ素原子の脱離が起きているが、先行研究においては、フッ素原子の脱離はアルコールや水が存在する場合に起こりやすいと考えられている [39–42]。さらに、トリフルオロメチルベンゼン誘導体の場合は、電子供与基がフェニル基に結合している場合に加溶媒分解が起こりやすいとされている [39,41]。これらの先行研究の類推から、**product 5** は、フルタミドから **product 4** を経由して生成していると予想された。この仮説を確かめるため、**product 4** の 2-プロパノール溶液についても、フルタミドの 2-プロパノール溶液を同じ条件で照射実験を行った。**product 4** の 2-プロパノール溶液に対し、溶存酸素存在下と溶存酸素非存在下でそれぞれ 2 分間照射を行い、その生成物を GC-MS で分析した。この時のガスクロマトグラムを Figure II-2-5 に示す。Figure II-2-5 (a) に示すように、溶存酸素が存在する場合には、保持時間 6.24 分の **product 4** のピークしか見られない。それに対し、溶存酸素が存在しない場合 (Figure II-2-5 (b)) には、保持時間 6.24 分の **product 4** のピークに加えて、7.88 分に **product 5** のピークが確認された。この結果は、**product 5** はフルタミドから **product 4** を経由して生じていることを示している。さらに、この結果から **product 4** から **product 5** への変換は、溶存酸素が存在しない条件で加速されることが示された。溶存酸素はトリフルオロメチル基の加溶媒分解を抑制している可能性があると言える。

先行研究において、2-hydroxy-4-trifluoromethyl-benzoic acid のトリフルオロメチル基の加溶媒分解は酸素やシクロヘキサジエン、ナフタレンなどの三重項消光剤により影響を受けるとされており、その加溶媒分解は励起三重項において起きることが示唆されている [40]。本研究においても、**product 4** の加溶媒分解は酸素が存在する場合に、その進行が抑制されている。これらの結果から、トリフルオロメチルベンゼン誘導体の加溶媒分解は励起三重項状態から起きている可能性が考えられた。Chaignon らは 3,5-diaminobenzotrifluoromethylbenzene に対して、310 nm の光を照射させた場合に脱フッ素化が起きたことを報告した [41]。しかし、3,5-dinitrobenzotrifluoromethylbenzene に同様に照射実験を行った際には脱フッ素化は起こらなかったとしている。これらのトリフルオロメチルベンゼン誘導体の光反応の類推から、トリフルオロメチル基の加溶媒分解にとって、ニトロ基からアミノ基への変換は必須である可能性が考えられた。

product 4 から **product 5** 生成の予想される反応機構を Scheme II-2-3 に示す。



Scheme II-2-3. Proposed reaction mechanism for the generation of product **5** from product **4**.

Product **5** の予想される反応機構において、まず始めに励起されたトリフルオロメチル基の炭素が 2-プロパノールからの求核攻撃を受けてフッ素イオンが脱離する。次に、脱離したフッ素イオンは前の段階で付加した 2-プロパノールに由来するメチル基から水素原子を引き抜く。この段階では E2 脱離機構により二つ目のフッ素が脱離し、アシルフルオライドが生成する。そのアシルフルオライドは、2-プロパノールにより求核攻撃を受け、最終的に product **5** を生成する。

Product **1** や product **3** からトリフルオロメチル基の加溶媒分解が起こるのか確かめるため、フルタミドや product **4** に対する照射実験と同じ条件で、product **1** と product **3** に対し照射実験を行った。その結果、照射により何らかの光反応が進行していることが確認されたが、2-プロパノール溶液中における product **1, 3** からのトリフルオロメチル基の加溶媒分解は確認されなかった。Chaignon らはトリフルオロメチルベンゼン誘導体の光反応において、トリフルオロメチル基の加溶媒分解は第一級アミンのような電子供与性の置換基がフェニル基に結合していない限り進行しないとしており [41]、彼らの主張は、本研究において product **3** から加溶媒分解が進行しなかった実験結果と一致している。このことから電子供与性置換基の存在が加溶媒分解の進行に影響している可能性が高いと予想されるが、ヒドロキシ基を持つ product **1** の照射実験において、加溶媒分解は観察されなかった。Product **1** と product **4** は良く似た吸収スペクトルを示しているため (Figure II-2-3)、同程度の光エネルギーを吸収していると考えられる。そのため、product **1** と product **4** の光反応がどのように進行するのか決めるのは、ヒドロキシ基とアミノ基の化学的・物理的性質に依存していると考えられた。少なくとも、この研究結果からは、トリフルオロメチルベンゼン誘導体の加溶媒分解の進行には、アニリン構造

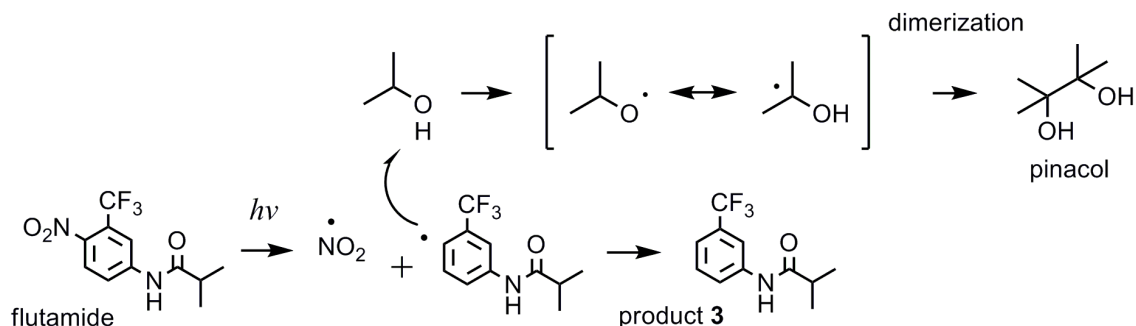
が必須であり、フェノール構造では不十分であるということが考えられた。このことが、**product 4** が生成しやすい 2-プロパノール溶液においてのみ **product 5** が確認された理由であると言える。2-プロパノールのヒドロキシ基の水素は解離しやすく、水素引き抜き反応において効率のよい水素供与体となる。このことが、フルタミドから **product 4** の変換を有利にさせていると考えられる。芳香族ニトロ化合物の光還元反応について言えば、Hurley と Testa によって、2-プロパノール溶液中のニトロベンゼンの光反応について報告がある [14]。彼らは、ニトロベンゼンに 366 nm の光を照射した場合に、2-プロパノールからの水素引き抜き反応が起きた結果、ニトロ基の還元が起こるとしている。加えて、彼らは、水素引き抜き反応が進行したことの証拠に、副生成物としてアセトンが生成していることをガスクロマトグラフィーにより確認している。芳香族ニトロ化合物の光還元反応は、2-プロパノール以外にもエタノールなどの溶媒においても進行することが報告されている [14-16,23]。

フルタミドと 2-プロパノールの間に起きた反応について詳細に調べるため、重水素化 2-プロパノールを溶媒として照射実験を行った。しかし、光照射の有無にかかわらず、フルタミドやその光反応生成物を 2-propanol-d8 に溶解させるとすぐに、アミノ基やヒドロキシ基、アミド基のプロトンの交換が起きた。そのため、**product 4** のアミノ基に含まれる二つの水素原子が溶媒由来であるのか確かめることができなかった。しかし、2-product-d8 溶液を用いた照射実験において生成された **product 3** では、フルタミドにおいてニトロ基が位置していた場所に、重水素が結合していることがわかった。このことは、フルタミドの光脱離により生じたフェニルラジカルが、2-propanol-d8 から水素を引き抜いたことを示している。さらにこの結果は、**product 3** の生成においては溶媒からの水素引き抜きの過程が含まれることを示している。**product 3** は 2-プロパノール溶液においてのみ生成が確認されたのだが、このことは、2-プロパノールがアセトニトリルよりも水素引き抜き反応に有利な特性を持っているからであると考えられる。

水素引き抜き反応の詳細について調べるため、フルタミドの 2-プロパノール溶液について、さらに 1×10^{-4} M の溶液を調製し照射実験を行った。この 1×10^{-4} M の 2-プロパノール溶液について、照射実験を行ったところ **product 3** とピナコールが生成していることが確認された。このことは、 1×10^{-4} M の 2-プロパノール溶液においては、フルタミドの光脱離反応が主反応となることを示している。ピナコールは、照射後のフルタミドの 1×10^{-3} M の 2-プロパノール溶液においてもごくわずかに存在が確認されていたのが、生成量が GC-MS の検出限界に近く、正確な定性が困難であった。2-プロパノール溶液を溶媒として用いたことで、水素引き抜き反応が優先的に起こると考えられるが、 1×10^{-4} M の 2-プロパノール溶液においては、**product 4** の生成は確認することができなかった。 1×10^{-4} M の 2-プロパノール溶液においてのみ、光脱離反応が優先的に進行した理由は現在検討中である。しかし、この結果からフルタミドの光反応は濃度依存性がある反応だという可能性が示唆された。つまり、フルタミドが単分子的に光反応を起こ

しているのではなく、励起分子と溶媒間の反応が関与している可能性が考えられた。溶媒など他の分子と相互作用をした結果、フルタミドの励起状態が変化して光反応に多様性が生じたことが予想される。

Product 3 の予想される反応機構を Scheme II-2-4 に示す。



Scheme II-2-4. Proposed reaction mechanism for the generation of product 3 and pinacol.

Scheme II-2-4 に示すように、product 3 の生成反応はフルタミドが光脱離反応により、フェニルラジカルと二酸化窒素ラジカルを生じさせることで開始される。フェニルラジカルは 2-プロパノールから水素を引き抜き、product 3 とケチルラジカルを生成する。ケチルラジカルは異性化を起こして二量体化し、ピナコールを生成する。本節における研究では、2-プロパノールのどの位置の水素が引き抜かれたのかを同定することはできなかった。けれども、解離性のプロトンであるヒドロキシル基の水素が最も可能性が高いと考えられた。この照射実験の結果はから、フルタミドの光反応では溶質と溶媒間の反応が含まれる可能性が高いことが示された。

II-2-4. 結論

本節における研究では、アセトニトリルと 2-プロパノールの二つの溶媒を用いてフルタミドの光反応を比較した。先行研究において、フルタミドの均一溶媒中における光反応は、ニトロ-ニトリト転位反応生成物が唯一の光反応生成物であるとされていた。しかし、本節における研究の結果からは、フルタミドのニトロ-ニトリト転位生成物はアセトニトリル溶液においてのみ優先的に確認された。2-プロパノール溶液中の光反応においては、ニトロ-ニトリト転位反応よりも光還元反応が優先的に進行した。その理由は、2-プロパノールが光還元反応における水素引き抜き反応を有利にさせたからであると考えられる。加えて、2-プロパノール溶液中の光反応では、トリフルオロメチル基の加溶媒分解が進行することが示された。この加溶媒分解が起こるためには、光還元生成物が形成される必要があると予想された。

本節における研究の結果から、フルタミドが高い光反応性を持ち、多様な光反応を起

こすことが示された。フルタミドの副作用である、光線過敏症の原因物質の特定には至らなかったが、この研究結果は、はっきりとフルタミドが太陽光に含まれる紫外線により光分解を起こすことを示している。フルタミドの光反応は反応中間体としてラジカルを形成すると予想される。このラジカルが生体内高分子と反応を起こした化合物が、免疫原性物質となる可能性が考えられる。また、光線過敏症の発症には、光反応により生じた生成物が原因物質となっている可能性がある。さらに、光により励起されたフルタミドが生体内の酸素分子を活性化することで、炎症反応を惹起した可能性もある。本節における研究の結果は、フルタミドが高い光反応性と多様な光反応を起こしうることを示しており、今後の光線過敏症の発症メカニズムの解明に役立つことが期待される。

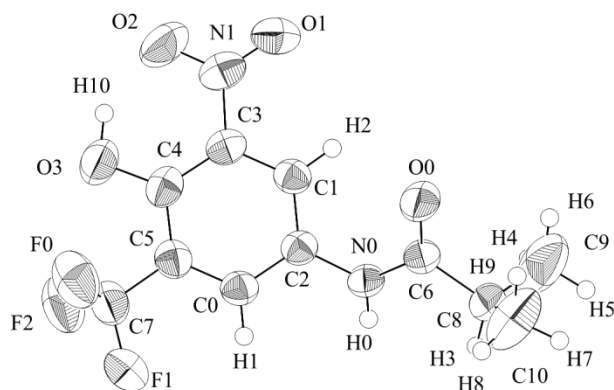


Figure II-2-1. ORTEP structure of *N*-[4-hydroxy-3-nitro-5-(trifluoromethyl)phenyl]-2-methylpropanamide, showing 50% probability ellipsoids.

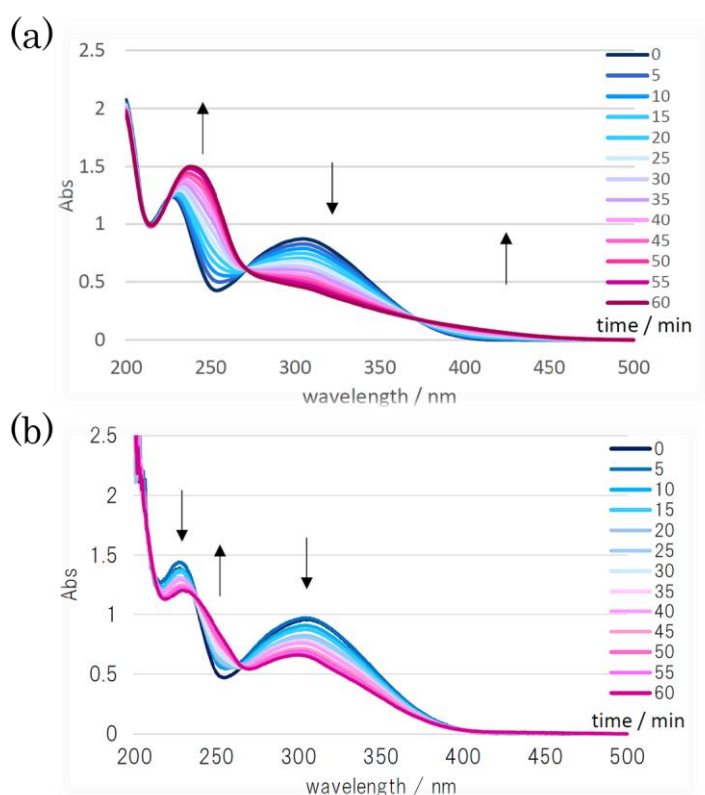


Figure II-2-2. Time course of absorption spectra for flutamide in (a) aerated acetonitrile and (b) deaerated acetonitrile. The photoreactions were monitored at 5 min intervals. The arrows in each spectrum represent the direction in which the absorption intensity is changing.

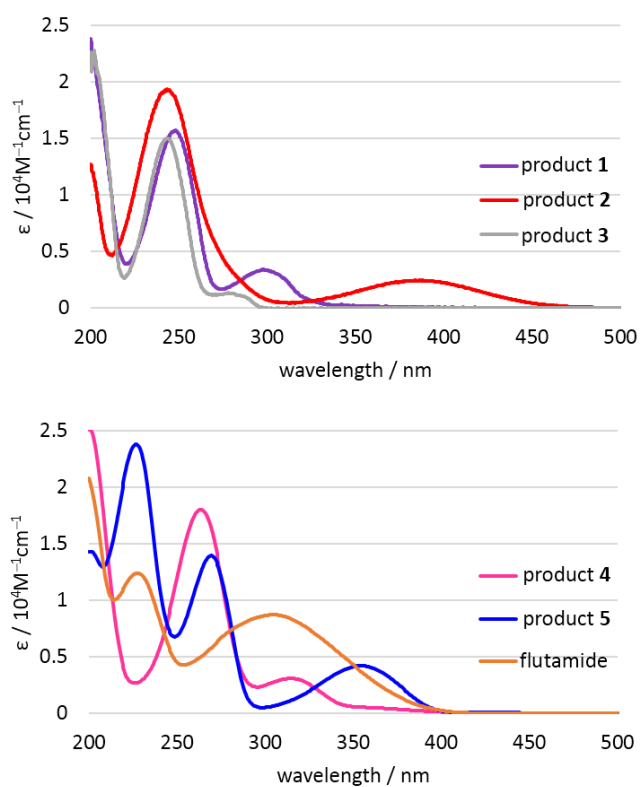


Figure II-2-3. Absorption spectra of the photoproducts and flutamide in acetonitrile. The maximum absorption wavelengths for products **1**, **2**, **3**, **4**, **5** and flutamide were 248, 243, 264, 227, 228 and 225 nm, respectively.

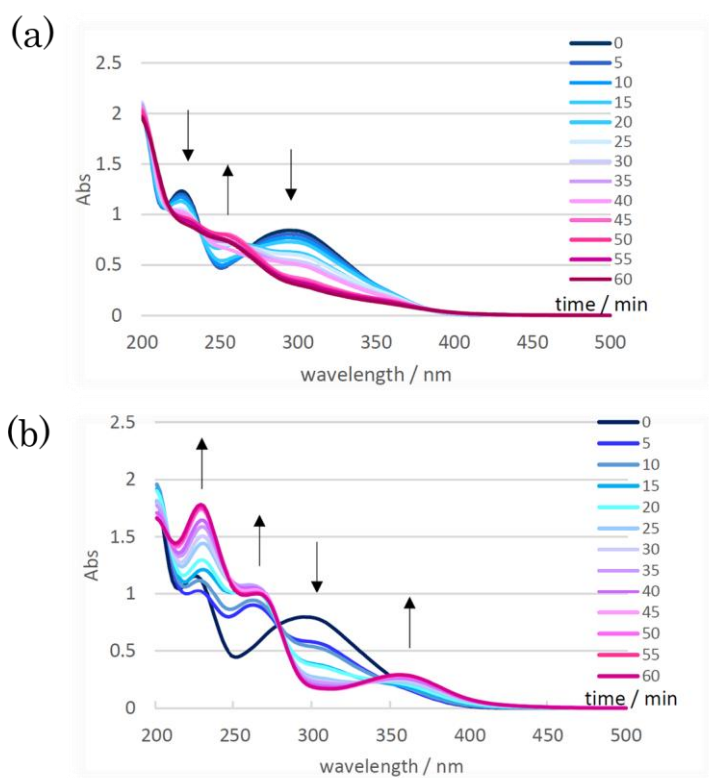


Figure II-2-4. Time course of absorption spectra for flutamide in (a) aerated 2-propanol and (b) deaerated 2-propanol. The photoreactions were monitored at 5 min intervals. The arrows in each spectrum represent the direction in which the absorption intensity is changing.

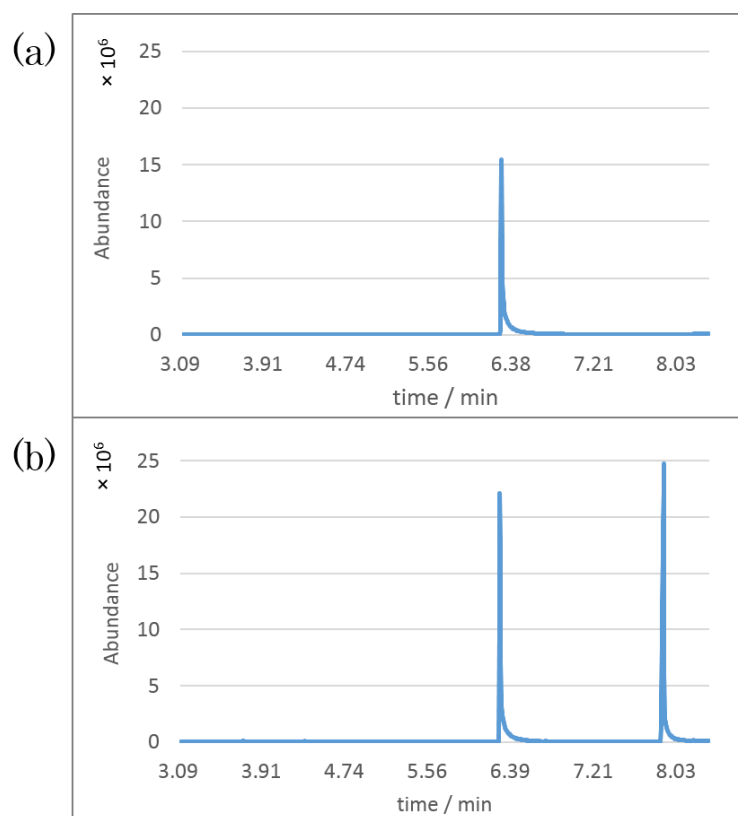


Figure II-2-5. Gas chromatogram of product **4** in (a) aerated 2-propanol and (b) deaerated 2-propanol after being irradiated with UV. The peaks at retention times of 6.24 min and 7.88 min were identified as products **4** and **5**, respectively.

II-3. 2-nitrobenzofuran と 3-methyl-2-nitrobenzofuran の光反応についての研究

II-3-1. 序

芳香族ニトロ化合物の光反応は、光化学・光物理学においてだけでなく、様々な側面から研究がなされている。代表的な例として、第 II-2 節では前立腺癌治療薬のフルタミドの例を挙げたが、ニトロ多環芳香族炭化水素 (Nitropolycyclic aromatic hydrocarbon; NPAH) も、環境学的な重要性から研究が行われている [43,44]。NPAH は有害な大気汚染物質として知られている化合物の総称である。NPAH は強い変異原性と発癌性を有するため、NPAH 形成の反応機構が研究されている。NPAH の炭化水素骨格には、ピレンやアントラセン、クリセンなど様々なものが含まれるが、その反応機構は全てラジカル連鎖反応により進行するとされる。そして、その開始反応は、大気中の硝酸ラジカルやヒドロキシルラジカルによる付加反応であると考えられている。様々な種類の NPAH について、光分解による半減期が見積もられている [44]。

NPAH に限らず、ニトロ基が置換した様々な多環芳香族化合物の光反応が研究されている [18-29,46,47]。なかでも、複素環骨格を持つ芳香族ニトロ化合物の例として、Hunt と Reid は 2-ニトロフランや 2-ニトロピロールのような 5 員環の芳香族複素環化合物について研究を行っている。彼らの報告によれば、2-ニトロフランをメタノール溶媒中で光照射すると、ニトロ基の転位反応が起こり 3-ヒドロキシイミノ-2-オキソ-2,3-ジヒドロフランが生成するとしている [46]。同様の光反応生成物が 2-ニトロピロールにおいても得られている。加えて、3-メチル-2-ニトロフランの光反応においては、ニトロ基の転位反応は 5 位炭素で起こり、5-ヒドロキシイミノ-3-メチルイミノ-2-(5H)-オンが生じるとされている [47]。これら化合物の光転位反応はニトロオレフィンにおける光反応に良く似たものであることがわかっている [48-50]。本研究では、ニトロ置換芳香族複素環化合物の例として、2-ニトロベンゾフラン誘導体を研究対象としてその光反応を検討した。2-ニトロベンゾフランの構造は、ニトロ基と芳香環平面が共平面に存在する化合物である。Chapman らにより提唱されたニトロ-ニトリト転位反応では、ニトロ基と芳香環のねじれが転位反応の誘因になるとされている [24]。また、北村と松浦はニトロベンゼンに立体障害のある置換基を導入し、ニトロ基と芳香環の平面が共平面にない構造を持つニトロベンゼンの光反応を検討している [51]。彼らは、2,6 位にアルキル基を導入したニトロベンゼンに光を照射し、その光反応を Chapman らが提唱したニトロ-ニトリト転位により説明している。置換基を持たないニトロベンゼンは、2-プロパノールのような水素供与性の溶媒を用いて光を照射すると、光還元反応が進行するが、北村と松浦による研究結果では、2,4,6-トリメチルニトロベンゼンの 2-プロパノール溶液における光反応では、光還元反応と同時にニトロ-ニトリト転位反応が観察されている。

これまでに、ニトロ-ニトリト転位がニトロ基と芳香環が共平面にあったとしても起こることを明示的に示した研究はない。本研究では、2-ニトロベンゾフランの 3 位にメ

チル基を導入して、立体障害の小さいアルキル基による置換基効果についても検討を行った (Figure II-3-1-1)。2-ニトロベンゾフランの構造は、ニトロ基と芳香環平面が共平面に存在する化合物である。2-ニトロベンゾフランとその 3-メチル誘導体の光反応について検討することは、芳香族ニトロ化合物の二面角とニトロ-ニトリト転位の関連性を解明することにつながると期待される。さらに、本研究はニトロ置換芳香族複素環化合物の光反応についても新たな知見を与え、光に安定な芳香族ニトロ化合物を設計することに役立つと考えられる。

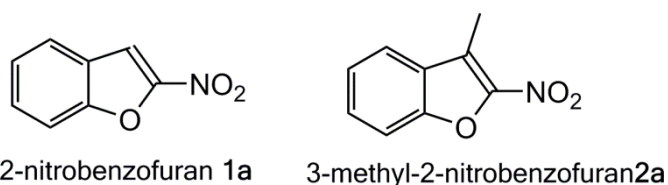


Figure II-3-1-1. Chemical structures of 2-nitrobenzofuran **1a** and 3-methyl-2-nitrobenzofuran **2a**.

II-3-2. 方法

II-3-2-1. 試薬

合成反応に用いた試薬と溶媒は全て試薬等級で、購入したままの状態 で用いた。照射実験には、HPLC 等級のアセトニトリル (Nacalai Tesque) を用いた。2-ニトロベンゾフラン **1a**、3-メチル-2-ニトロベンゾフラン **2a**、オキシム生成物 **1g** は過去の文献を参考に合成した [52,53]。

II-3-2-2. 分析機器

光反応生成物の単離を目的とした内部照射実験では、高圧水銀灯 (UVL-100HA-100P, Riko) を光源として用いた。定性実験と量子収率の決定には、超高圧水銀灯 (UI-501C, Ushio 電気株式会社) を用いた。¹H-NMR および ¹³C-NMR の測定には、JOEL-ECS-400 を利用した。IR スペクトルには JASCO FT/IR-400 を用いた。GC-MS には Hewlett-Packard HP6890/5793 MSD を利用した。吸収スペクトルには Hitachi U-2310 分光光度計を用いて測定した。X 線結晶構造解析には Mo K α 光源 ($\lambda = 0.7107 \text{ \AA}$) を用いて Rigaku RAXIS-RAPID を利用した。

定性実験に用いた HPLC には Shimadzu LC-6AD を用いて、順相カラム (関東化学, Mightysil Si60, 250 mm \times 4.6 mm \times 5 μ m) で分析を行った。検出器には紫外可視分光光度計 (Shimadzu, SPD-10A UV-Vis detector) を用いた。検出波長は 313 nm とし、流速は 1 mL/min とした。移動相には、ヘキサンと酢酸エチルを 4:1 の比率の溶液を用いた。ラセミ化合物の分離にはキラルカラム (Daicel, CHIRAL OJ-H, 250 mm \times 4.6 mm \times 5 μ m) を用い、検出波長を 270 nm とした。

II-3-2-3. 合成と同定

出発物質である 2-ニトロベンゾフラン **1a** と 3-メチル-2-ニトロベンゾフラン **2a** は下記の合成法により、合成したものを照射実験に用いた。

2-Nitrobenzofuran **1a** の合成

2-ニトロベンゾフランの合成は過去の論文に記載された合成法を参考に合成した [52]。ベンゾフラン (10.72 g, 90.86 mmol) を 50 mL の溶液に無水酢酸に溶かし、ammonium cerium (III) nitrate tetrahydrate (16.91 g, 30.29 mmol) を加え 5 日間攪拌させた。反応終了後、反応液を酢酸エチルで抽出した。有機相を無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、エバポレーターで溶媒を除去し濃縮させた。カラムクロマトグラフィー (SiO₂; 5:95 EtOAc/hexane) で精製し、水とエタノールから再結晶した後、目的とする 2-ニトロベンゾフラン **1a** を得た (460 mg, 3%)。副生成物として 4-ニトロベンゾフラン (59 mg, below 1%) と 6-ニトロベンゾフラン (142 mg, 1%) を得た。

Spectra data of 2-nitrobenzofuran **1a**:

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ : 7.78 (1H, ddd, $J = 7.9, 1.2, 0.8$ Hz), 7.69 (1H, d, $J = 0.8$ Hz), 7.64 (1H, ddd, $J = 8.5, 1.6, 0.8$ Hz), 7.61 (1H, ddd, $J = 8.5, 6.5, 1.2$ Hz), 7.43 (1H, ddd, $J = 8.0, 6.5, 1.6$ Hz). MS (EI) m/z 163 (M^+ , base peak), 147, 133, 117, 105, 89, 63.

Spectra data of 4-nitrobenzofuran:

¹H-NMR (400 MHz CDCl₃) δ : 8.2 (1H, dd, $J = 8.2, 0.9$ Hz), 7.86 (1H, d, $J = 2.3$ Hz), 7.84 (1H, ddd, $J = 8.2, 0.9, 0.9$ Hz), 7.52 (1H, dd, $J = 2.3, 0.9, 1.2$ Hz), 7.43 (1H, dd, $J = 8.2, 8.2$ Hz). MS (EI) m/z 163 (M^+ , base peak), 147, 133, 117, 105, 89, 63.

Spectra data of 6-nitrobenzofuran:

¹H-NMR (400 MHz CDCl₃) δ : 8.43 (1H, dd, $J = 2.3, 0.9$ Hz), 8.19 (1H, dd, $J = 8.7, 2.3$ Hz), 7.89 (1H, d, $J = 2.3$ Hz), 7.71 (1H, d, $J = 8.7$ Hz), 6.91 (1H, dd, $J = 2.2, 1.0$ Hz). MS (EI) m/z 163 (M^+ , base peak), 147, 33, 117, 105, 89, 63.

3-Methyl-2-nitrobenzofuran **2a** の合成

2 mL の発煙硝酸 (5 mmol) と 4.8 mL の無水酢酸の混液に、窒素雰囲気下 3-methylbenzofuran (500 mg, 3.79 mg) を滴下し、90 分間攪拌させた。反応終了後、酢酸エチルと水で分液し、有機相を無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、エバポレーターで濃縮させた。カラムクロマトグラフィー (SiO₂; 1:16 EtOAc/hexane) により精製し、メタノールと水から再結晶したところ、目的とする 3-メチル-2-ニトロベンゾフラン **2a** を得た (70 mg, 10%)。

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ: 7.73 (1H, ddd, *J* = 8.0, 1.3, 0.8 Hz), 7.61 (1H, ddd, *J* = 8.3, 6.2, 1.3 Hz), 7.58 (1H, ddd, *J* = 8.3, 2.1, 0.8 Hz), 7.42 (1H, ddd, *J* = 8.0, 6.2, 2.1 Hz), 2.72 (3H, s). MS (EI) *m/z* 177 (M⁺, base peak), 160, 147, 132, 103, 91, 77.

3-(Hydroxyimino)benzofuran-2(3*H*)-one (oxim product **1g**) の合成

3-(Hydroxyimino)benzofuran-2(3*H*)-one は過去の文献に記載された合成法を参考に合成した [53]。

II-3-2-4. 内部照射実験

光反応生成物の単離と同定のため、内部照射実験を行った。試料 (2-ニトロベンゾフラン **1a** もしくは 3-メチル-2-ニトロベンゾフラン **2a**) をアセトニトリルに溶解させ、陰圧下、超音波処理により溶存酸素を除去した。Pyrex 製の反応容器に試料溶液を入れ、酸素が試料溶液に混入するのを防ぐため、反応開始直前と反応の全体を通して、絶えず窒素バブリングを行った。照射実験では、290 nm より長波長の光を当てた。反応終了後に、試料溶液からエバポレーターで溶媒を除去し、カラムクロマトグラフィー (SiO₂; 1:4 EtOAc/hexane) で精製処理を行った。2-ニトロベンゾフラン **1a** と 3-メチル-2-ニトロベンゾフラン **2a** に対するそれぞれの照射条件について Table II-3-1 に示す。

Table II-3-1. Irradiation conditions for preparative experiments.

Sample	quantity/mg	concentration/M	time*/min	product	yield/mg (yield/%)
1a	33	2.0×10^{-2}	50	1g	15.7 (48)
2a	18	1.0×10^{-2}	15	2f	3.5 (24)
				2g	5.0 (34)

* time for irradiation experiments

照射実験の結果、光反応生成物 **1g**、**2f**、**2g** の単離に成功し、各種分析機により同定した。同定に利用したスペクトルデータを下記に示す。

Spectra data of 3-(hydroxyimino)benzofuran-2(3*H*)-one (oxime photoproduct **1g**):

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ: 8.10 (1H, dd, *J* = 7.8, 1.5 Hz), 7.52 (1H, ddd, *J* = 8.1, 7.8, 1.5 Hz), 7.25 (1H, ddd, *J* = 7.8, 7.8, 1.0 Hz), 7.17 (1H, dd, *J* = 8.1, 1.0 Hz). ¹³C-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ: 162.9, 154.8, 141.4, 133.9, 127.8, 125.0, 117.0, 111.5. IR (KBr) cm⁻¹: 3176, 3059, 2854, 1797, 1609, 1455, 1357, 1034, 977, 875, 757. MS HRMS (FAB⁺) C₈H₆NO₃ obsd 164.0359, calcd 163.0345. MS (EI) *m/z* 163 (M⁺, base peak), 135, 118, 105, 90.

Spectra date of 3,3'-dimethyl-3,3'-bibenzofuran-2,2'(3*H*,3'*H*)-dione (3R, 3'R and 3S, 3'S) (racemic photoproduct **2f**):

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ: 7.21 (1H, ddd, *J* = 7.6, 1.5, 0.6 Hz), 7.11 (1H, ddd, *J* = 8.0, 7.6, 1.5 Hz), 7.01 (1H, ddd, *J* = 7.6, 7.6, 1.1 Hz), 6.79 (1H, ddd, *J* = 8.0, 1.1, 0.6 Hz), 1.86 (3H, s). ¹³C-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ: 176.6, 152.8, 130.0, 128.4, 124.08, 124.06, 111.7, 51.2, 18.4. IR (KBr) cm⁻¹: 2925, 1796, 1620, 1478, 1464, 1454, 1050, 900, 751. HRMS (FAB⁺) C₁₈H₁₅O₄ obsd. 295.0961, calcd. 295.0966.

Spectra data of 3,3'-dimethyl-3,3'-bibenzofuran-2,2'(3*H*,3'*H*)-dione (3R, 3'S or 3S 3'R) (meso photoproduct **2g**):

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ: 7.34 (1H, ddd, *J* = 8.2, 7.6, 1.4 Hz), 7.07 (1H, ddd, *J* = 8.2, 1.1, 0.7 Hz), 7.05 (1H, ddd, *J* = 7.6, 7.6, 1.1 Hz), 6.71 (1H, ddd, *J* = 7.6, 1.4, 0.7 Hz), 1.78 (3H, s). ¹³C-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ: 176.9, 151.8, 129.5, 128.6, 124.5, 123.1, 110.3, 50.9, 17.5. IR (KBr): cm⁻¹ 2925, 1805, 1617, 1477, 1462, 1454, 1041, 900, 754. HRMS (FAB⁺) C₁₈H₁₅O₄ obsd. 295.0975, calcd. 295.0966.

II-3-2-5. 定性実験

光反応生成物の定性のため、310 nm の短波長を用いて照射実験を行い、吸収スペクトルを測定することで光反応の経時変化をモニターした。

試料溶液の溶媒にはアセトニトリル (HPLC 等級、Nacalai Tesque) を用い、試料溶液に含まれる溶存酸素は凍結融解法により除去した。その際、試料溶液を封入する前に凍結と融解を3回繰り返した。照射実験においては、UV-31 (Toshiba) と赤外線を除去するために、蒸留水を満たした円筒型セルを介して照射を行った。光源のレンズから試料溶液までの距離を30 cm とし、光反応の経時変化を、紫外可視分光光度計を用いてモニターした。照射実験終了後に HPLC を用いて試料溶液を分析した。

2-ニトロベンゾフラン **1a** の光分解の量子収率は、シュウ酸鉄 (II) 化学光量計を用いた [54,55]。超高圧水銀ランプ (USHIO, UI-501C) を光源として、UV-31 (TOSHIBA)、U340 (HOYA) をフィルターとして用いた。さらに、ピーク波長が313 nm となるように硫酸ニッケル水溶液を満たした円筒型セルを介して照射を行った。試料溶液に流入した光量は約 3×10^{16} quanta s⁻¹ だった。313 nm における2-ニトロベンゾフラン **1a** の光分解の量子収率は、次の式を用いて計算した [27]。

$$\Phi = (d[X]/dt)v/FI$$

ここで、 $d[X]/dt$ は出発物質分解の初速度、 v は試料溶液の体積、 F は313 nm において出発物質に吸収された光子の数である。また、 F は吸収波長 (Å) に依存し、 $F = 1 - 10^{-A}$

で表すことができる。 I は光の強度 ($\text{mol of photons min}^{-1}$) である。2-ニトロベンゾフラン **1a** の量子収率は 60 秒の照射後の試料溶液を用いて決定した。量子収率決定の照射実験において、ほとんどの光反応生成物の生成量は検出限界以下であった。唯一、2-ニトロベンゾフラン **1a** から生じた 3-(hydroxyimino)benzofuran-2(3*H*)-one (オキシム化合物 **1g**) の生成が HPLC で確認されたものの、定量をすることはできなかった。

II-3-2-6. X 線結晶構造解析

2-ニトロベンゾフラン **1a** と 3-メチル-2-ニトロベンゾフラン **2a** の、芳香環とニトロ基の平面間の二面角を測定するため、X 線結晶構造解析を行った。その結晶データと実験条件を Table II-3-2, II-3-3 に示す。さらに、オルテップ図と結晶格子における配置を Figure II-3-1, II-3-2 に示す。

Table II-3-2. Crystal and experimental data of 2-nitorobenzofuran **1a**.

Chemical formula: $C_8H_5NO_3$

Formula weight = 163.13

T = 170 K

Crystal system: triclinic

Space group: $P-1$ Z = 1

a = 6.7279(7) Å

b = 7.3791(8) Å

c = 7.9859(9) Å

$\beta = 90.656(3)^\circ$

V = 357.71(7) Å³

D_x = 0.757 g/cm³

Radiation: Mo K α (λ = 0.7107 Å)

$F(0\ 0\ 0) = 84$

No. of reflections collected = 3446

No. of independent reflections = 1620

θ range for data collection: 3.060 to 27.435 °

Data/Restraints/Parameters = 1620/0/109

Goodness-of-fit on $F^2 = 1.137$

R indices [$I > 2\sigma(I)$]: $R1 = 0.0461$, $wR2 = 0.1743$

$(\Delta/\sigma)_{\max} = 0.000$

$(\Delta\rho)_{\max} = 0.239\ e\text{\AA}^{-3}$

$(\Delta\rho)_{\min} = -0.257\ e\text{\AA}^{-3}$

Measurement: Rigaku RAXIS-RAPID.

Program system: CrystalStructure 4.0, CRYSTALS

Structure determination: SHELXL-97

Refinement: full-matrix least-squares on F^2

Table II-3-3. Crystal and experimental data of 3-methyl-2-nitrobenzofuran **2a**.

Chemical formula: C₉H₇NO₃

Formula weight = 177.16

T = 103 K

Crystal system: triclinic

Space group: *P*-1 Z = 1

a = 6.3286(5) Å

b = 7.3922(7) Å

c = 9.4614(10) Å

β = 73.733(4)°

V = 396.68(7) Å³

D_x = 0.742 g/cm³

Radiation: Mo K α (λ = 0.7107 Å)

F(0 0 0) = 92

No. of reflections collected = 3892

No. of independent reflections = 1797

θ range for data collection: 3.17 to 27.50°

Data/Restraints/Parameters = 1797/0/118

Goodness-of-fit on *F*² = 1.070

R indices [*I* > 2 σ (*I*)]: *R*1 = 0.0343, *wR*2 = 0.1240

(Δ/σ)_{max} = 0.000

($\Delta\rho$)_{max} = 0.270 eÅ⁻³

($\Delta\rho$)_{min} = -0.280 eÅ⁻³

Measurement: Rigaku RAXIS-RAPID.

Program system: CrystalStructure 4.0, CRYSTALS

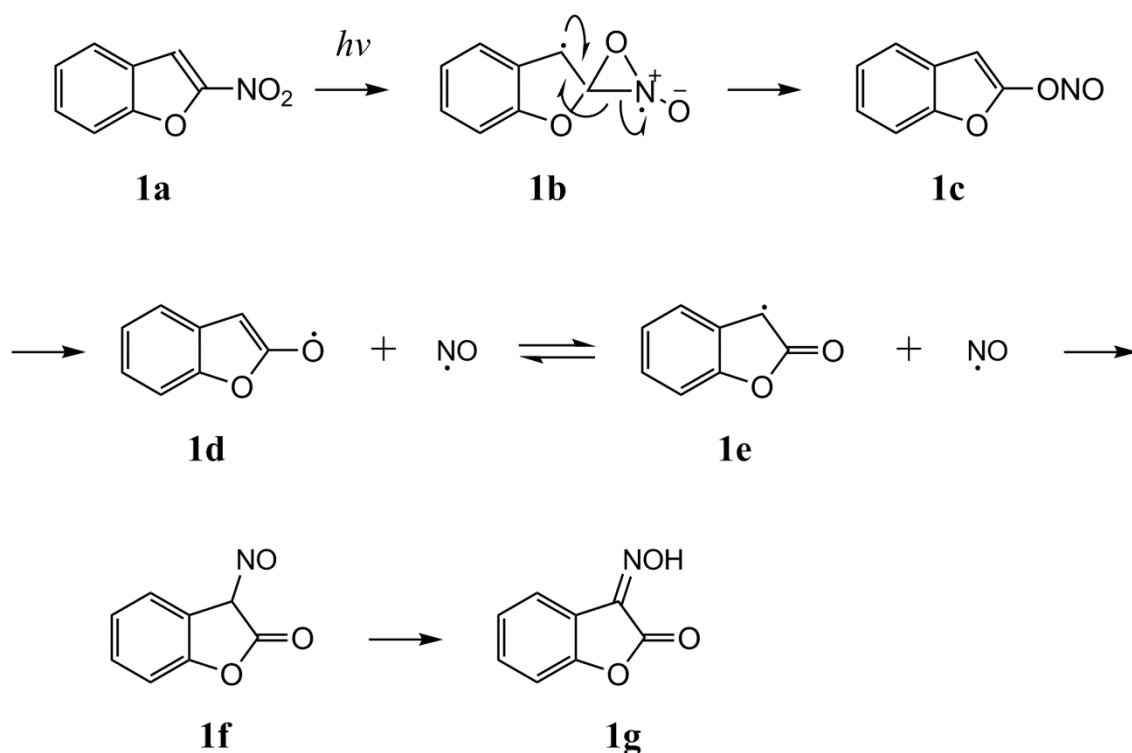
Structure determination: SHELXL-97

Refinement: full-matrix least squares on *F*²

II-3-3. 結果と考察

II-3-3-1.2-ニトロベンゾフランに対する内部照射実験

2-ニトロベンゾフラン **1a** に対する内部照射実験の結果、3-(hydroxyimino)benzofuran-2(3*H*)-one (オキシム化合物 **1g**) を 48 % の収率で得た。同様の光反応生成物が 2-ニトロフランや 3-メチル-2-ニトロフランにおいても得られていることから [46-47]、ベンゼンの置換は 2-ニトロフランの光反応性にさほど影響を与えないことが示唆された。オキシム化合物 **1g** の予想される反応機構を Scheme II-3-1 に示す。



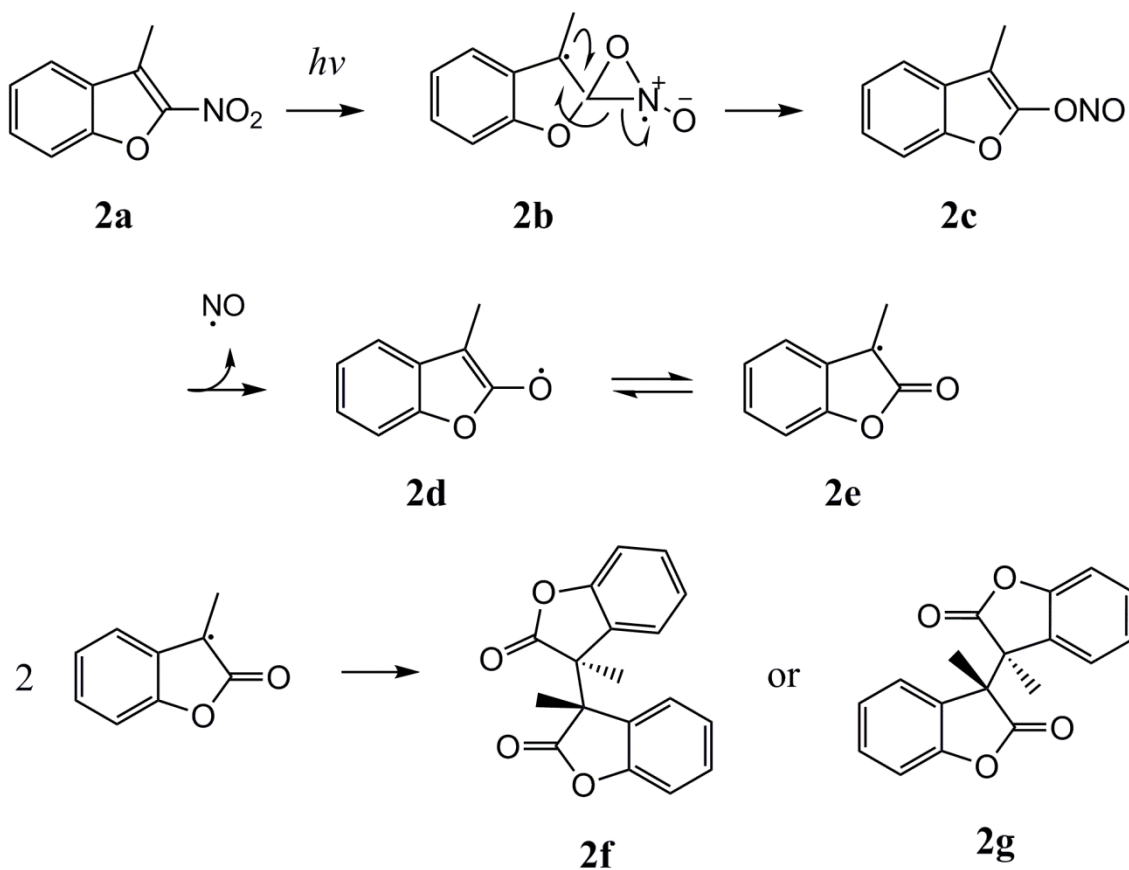
Scheme II-3-1. Proposed reaction mechanism of the photoreaction of 2-nitrobenzofuran **1a**.

2-ニトロベンゾフラン **1a** の光反応は、ニトロ-ニトリト転位により開始されると予想される。まず、出発物質である 2-ニトロベンゾフラン **1a** はビラジカルである **1b** を経由してニトリトである **1c** を形成する。そして、**1c** の N-O 結合が解裂することで **1d** が形成され、それと同時に一酸化窒素ラジカルが生成される。**1d** は、**1e** に異性化して一酸化窒素ラジカルと結合し、**1f** が形成される。**1f** が異性化することで最終生成物である **1g** が形成される。

II-3-3-2.3-メチル-2-ニトロベンゾフランに対する内部照射実験

3-メチル-2-ニトロベンゾフラン **2a** は二量体化生成物である **2f** と **2g** が生成されるこ

とがわかった。ラセミ化合物 **2f** とメソ化合物 **2g** の化学収率はそれぞれ、24 % と 34 % だった。3-メチル-2-ニトロベンゾフラン **2a** の光反応においても、2-ニトロベンゾフラン **1a** と同様に、ニトロ-ニトリト転位が進行したと考えられた。予想される反応機構を Scheme II-3-2 に示す。



Scheme II-3-2. Proposed photoreaction steps of 3-methyl-2-nitrobenzofuran **2a**.

3-メチル-2-ニトロベンゾフラン **2a** の光反応では、Scheme II-3-1 と同様に出発物質である **2a** がニトロ-ニトリト転位を起こすと考えられた。**2a** はニトロニトリト転位により、**2b** を経由して、ニトリトである **2c** を形成する。**2c** のニトリトの NO 結合が解裂することで、**2d** が形成される。この時、同時に一酸化窒素ラジカルが放出される。**2d** は **2e** に異性化した後、二量化を起こし、ラセミ体である **2f** とメソ体である **2g** を最終生成物として生成する。

3-メチル-2-ニトロベンゾフラン **2a** の光反応と 2-ニトロベンゾフラン **1a** の光反応との違いは、2-ニトロベンゾフラン **1a** は一酸化窒素ラジカルの再結合によりオキシム化合物 **1g** を形成したのに対し、3-メチル-2-ニトロベンゾフラン **2a** は、中間体 **2e** の二量体

化により最終生成物 **2f**、**2g** を形成した点にある。3-メチル-2-ニトロベンゾフラン **2a** の光反応においては、最終生成物は **2f** と **2g** 以外に確認されなかった。そのため、NO 結合の解裂で生じた一酸化窒素ラジカルは再結合を起こさず、反応の系中に拡散したと考えられた。3-メチル-2-ニトロベンゾフラン **2a** の中間体である **2e** が、もし一酸化窒素ラジカルとの再結合をしたことができたとしても、2-ニトロベンゾフラン **1a** の最終生成物である **1g** のように安定な構造をとることはできないと考えられる。そのため、3-メチル-2-ニトロベンゾフラン **2a** の光反応では、一酸化窒素ラジカルの再結合は起こらなかった、もしくは再結合したとしても可逆反応として再び解裂してしまったと考えられた。

II-3-3.3.2-ニトロベンゾフランの光反応における定性実験

2-ニトロベンゾフラン **1a** の吸収スペクトルの経時変化を Figure II-3-3 に示す。120 秒の照射後の吸収スペクトルにおいて、290 nm 付近の吸収が上昇している。この 290 nm 付近の吸収は、最終生成物であるオキシム化合物 **1g** の吸収によると考えられる。比較のため、出発物質 **1a** と最終生成物 **1g** の吸収スペクトルを Figure II-3-4 に示す。

2-ニトロベンゾフラン **1a** の 60 秒、120 秒照射後の試料溶液について、HPLC により分析した結果のクロマトグラムを Figure II-3-5 に示す。Figure II-3-5 の HPLC クロマトグラムにおいて、2.7 分と 4.1 分のピークはそれぞれ 2-ニトロベンゾフラン **1a** とその生成物である **1g** に由来している。これら二つのピークは 60 秒後 (Figure II-3-5 (a)) でも 120 秒後 (Figure II-3-5 (b)) でも見られた。ここで、120 秒の照射後の試料においてのみ、4.7 分に別のピークが見られた。このことは **1g** 以外にも、同定できていない光反応生成物が形成されている可能性を示唆している。長時間の照射により、ニトロ-ニトリト転位の競争反応や二次反応が引き起こされた可能性が考えられる。

2-ニトロベンゾフラン **1a** の X 線結晶構造解析の結果から、芳香環とニトロ基の平面が作る二面角は 0.78° であることがわかった。しかし、Chapman らにより提唱されたニトロ-ニトリト転位の反応機構では、9-ニトロアントラセンは芳香環平面に対しニトロ基がねじれているために転位反応が進行したと考えられている [24]。一方で、Lippert と Kelm は、4-フルオロニトロベンゼンの照射実験におけるニトロ基の光転位反応では、4-フルオロフェニルラジカルが生じると主張しており、芳香環とニトロ基の二面角については議論していない [29]。本研究において、4-フルオロニトロベンゼンの最適化構造を密度汎関数 B3LYP/6-311+G(d) で求めたところ、芳香環とニトロ基の平面はほとんど同一平面にあることがわかった。これらの結果は、芳香環とニトロ基がねじれておらず、同一平面上にあったとしてもニトロ-ニトリト転位が起こりうることを示している。さらに、Lippert と Kelm は 4-フルオロフェニルラジカルが生成した証拠として、4-フルオロビフェニルが生成したことを述べている。Lippert と Kelm が提唱した反応機構が正しいとするなら、ニトロ基の転位反応においてビフェニルのようなフェニルラジカルに由来する生成物が生成されるはずである。けれども、本節における研究結果では、2-ニト

ロベンゾフラン **1a** や 3-メチル-2-ニトロベンゾフラン **2a** の光反応において、フェニルラジカルに由来するような生成物は確認されなかった。一方で、Chapman らによる反応機構もオキサジリジンのような中間体の構造が証明されていないため、確固たるものではないと言える。しかし、本節における研究の結果により、芳香族ニトロ化合物の芳香環とニトロ基の平面が共平面にあったとしてもニトロ基の転位反応が起こりうることをはっきりと示すことができた。本研究では、2-ニトロベンゾフランや4-フルオロニトロベンゼンについて、基底状態の化学構造について議論してきたが、励起状態においてはその化学構造や電子状態が変化する可能性がある。励起状態における変化によって、芳香環とニトロ基の間に変化が生じ、Chapman らによる反応機構において提唱されたオキサジリジンが形成されやすくなることが考えられる。本研究の課題として、時間依存 DFT 計算により、これら化合物の励起状態における物理学的性質を予測することを計画している。

II-3-3-4.3-メチル-2-ニトロベンゾフランの光反応における定性実験

3-メチル-2-ニトロベンゾフラン **2a** の照射実験における吸収スペクトルの経時変化を Figure II-3-6 に示す。2-ニトロベンゾフラン **1a** の照射実験における吸収スペクトルの経時変化 (Figure II-3-3) と比較すると、3-メチル-2-ニトロベンゾフラン **2a** の光反応の方が 2-ニトロベンゾフラン **1a** の光反応よりも早いことがわかる。さらに、2-ニトロベンゾフラン **1a** と 3-メチル-2-ニトロベンゾフラン **2a** の分解の量子収率は、それぞれ 0.065 と 0.27 であり、3-メチル-2-ニトロベンゾフランの方が 4 倍ほど大きいことがわかった。量子収率の結果は、3-メチル-2-ニトロベンゾフラン **2a** の方が 2-ニトロベンゾフラン **1a** よりも光反応性が高いことを示している。このことは、2-ニトロベンゼンの 3 位にメチル基を導入した場合、その光反応性を高められることを示している。

3-メチル-2-ニトロベンゾフラン **2a** の照射実験後の試料溶液を HPLC で分析した際のクロマトグラムを Figure II-3-7 に示す。2.4、2.6、4.1 分において見られるピークはそれぞれ、ラセミ化合物 **2f**、3-メチル-2-ニトロベンゾフラン **2a**、メソ化合物 **2g** であることがわかった。この照射実験において確認された生成物は、3-メチル-2-ニトロベンゾフラン **2a** の内部照射実験において得られた化合物と同じものであった。しかし、Figure II-3-7 には、同定できていない化合物のピークも見られるため、3-メチル-2-ニトロベンゾフラン **2a** の光反応においても、同定できていない光反応生成物が生じている可能性がある。2-ニトロベンゾフラン **1a** の光反応と同様に、複数の光反応が同時に起きている可能性が考えられた。

II-3-4. 結論

本研究の結果から、2-ニトロベンゾフラン **1a** の光反応においてはニトロ-ニトリト転位が主反応となることがわかった。また、その光反応は 2-ニトロフラン [46, 47] やニ

トロオレフィン [48-50] の光反応と同じであることが示された。さらに、3-メチル-2-ニトロベンゾフラン **2a** もニトロ-ニトリト転位が主反応となっている可能性が示唆された。3-メチル-2-ニトロベンゾフラン **2a** の分解の量子収率は、2-ニトロベンゾフランの分解の量子収率よりもおよそ 4 倍大きく、3 位のメチル基が 2-ニトロベンゾフランの光反応性を高めたことを示唆している。これらの結果から、2-ニトロベンゾフランの光反応において、芳香環とニトロ基が共平面にあったとしてもニトロ-ニトリト転位が進行することが示された。この結果はヘテロ原子を含む芳香族ニトロ化合物の光反応を理解する上で有用な情報を与えるものであると期待される。

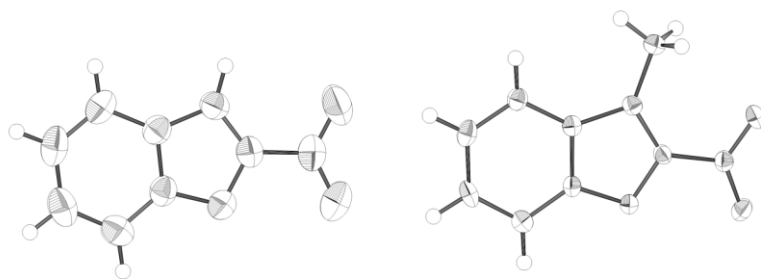


Figure II-3-1. ORTEP structures of 2-nitrobenzofuran **1a** (left) and 3-methyl-2-nitrobenzofuran **2a** (right) showing 50% probability ellipsoids.

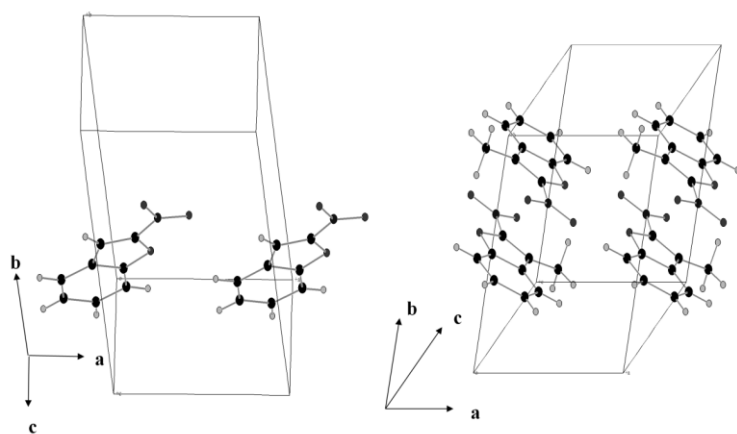


Figure II-3-2. Arrangement of 2-nitrobenzofuran **1a** (left) and 3-methyl-2-nitrobenzofuran **2a** (right) in the unit cell.

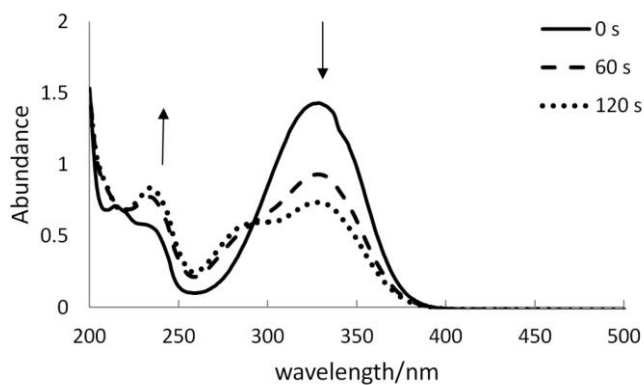


Figure II-3-3. Time course of the absorption spectra for 2-nitrobenzofuran **1a** in acetonitrile. The photoreactions were monitored at 60 s intervals. The absorption spectra at 0, 60, and 120 s are drawn in solid, dashed, and dotted lines, respectively. The arrows in each spectrum represent the direction of the changes in absorption intensity.

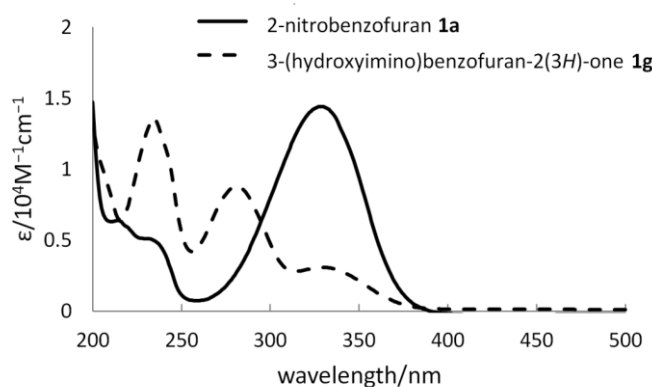


Figure II-3-4. Absorption spectra of 2-nitrobenzofuran **1a** (solid line) and oxim product **1g** (dashed line). The maximum absorption wavelengths for products **1a** and **2a** were 328 and 234 nm, respectively.

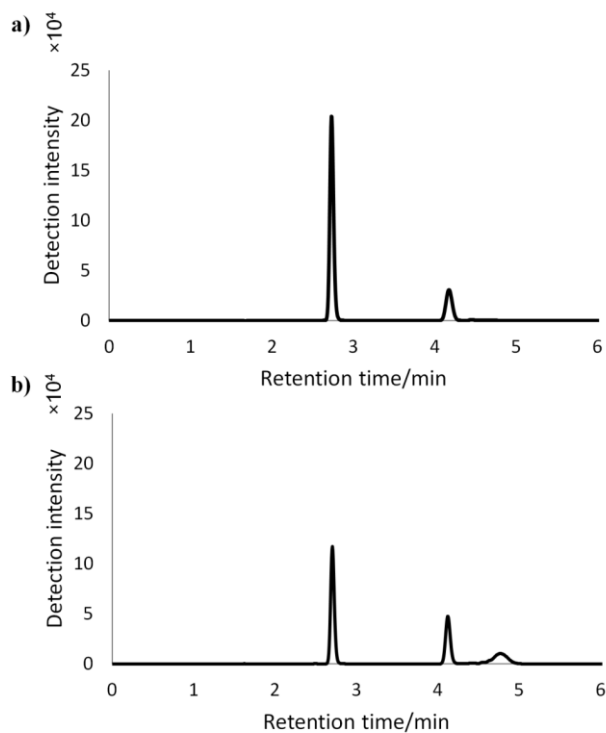


Figure II-3-5. HPLC chromatograms of 2-nitrobenzofuran **1a** analyzed after (a) 60 s and (b) 120 s irradiation. The peaks at the retention times of 2.7 and 4.1 min were identified as 2-nitrobenzofuran **1a** and the final compound **1e**, respectively.

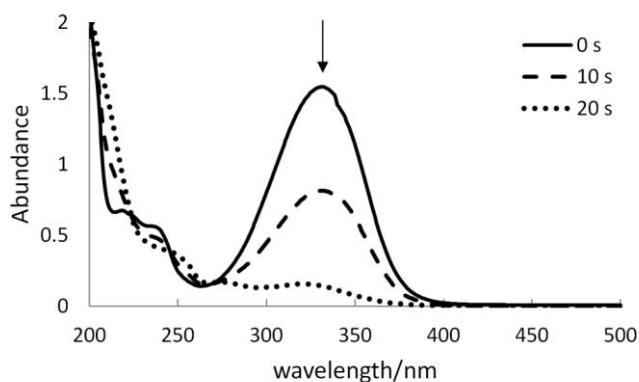


Figure II-3-6. Time course of the absorption spectra for 3-methyl-2-nitrobenzofuran **2a** in acetonitrile. The photoreactions were monitored at 10 s intervals. The absorption spectra at 0, 10, and 20 s are drawn in solid, dashed, and dotted lines, respectively. The arrows in each spectrum represent the direction of the changes in absorption intensity.

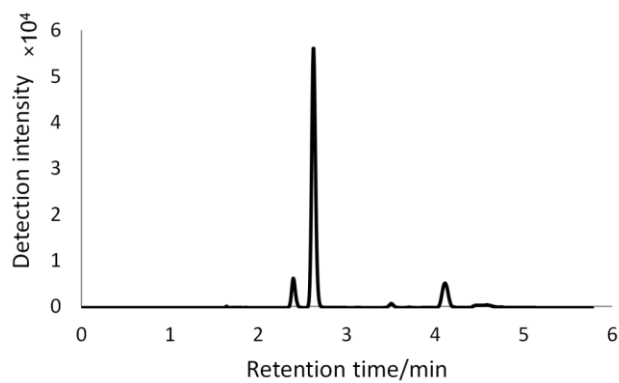


Figure II-3-7. HPLC chromatogram of 3-methyl-2-nitrobenzofuran **2a** analyzed after 10 s irradiation. The peaks at the retention times of 2.4, 2.6, and 4.1 min were identified as 3-methyl-2-nitrobenzofuran **2a**, meso compound **2d**, and racemic compound **2e**, respectively.

III. フルタミドの活性に影響を与える酵素的反応に対する物理化学的研究

III-1. 創薬におけるタンパク質計算化学 [56-58]

III-1-1. *in silico* 創薬

新薬の開発には、一般に、1万種類以上の化合物が検討されると言われている。その中から数百から数千種類の化合物が実際合成され、そのうちの百数十種類が *in vitro* screening を通過する。動物実験等でさらに十数種類が絞り込まれ、最終的にわずか 1 種類が臨床試験を通過するとされる。新薬開発において、その開発期間の長さは 8 年から 15 年と長く、開発費は 100 億から 150 億と莫大な額が費やされる。*in silico* 創薬とは、計算機を利用した合理的医薬品分子設計であり、医薬品開発の効率を上げることで、開発期間とコストの削減を目的に利用される。

III-1-2. タンパク質-医薬品化合物間の相互作用

医薬品が薬効を発揮するには、投与後に吸収・輸送の過程を経て、酵素や受容体などの標的分子と結合する必要がある。一般に、化合物と標的タンパク質との相互作用は *in vitro* screening において実験的に調べられる。そこで、合成された化合物のうち 70~90 % は除外される。この過程は、コンピュータを利用して化合物-標的分子間の相互作用を予測することで、80~95 % の確率で予測できるとされている。

タンパク質と医薬品化合物の相互作用は、鍵と鍵穴の関係に例えられるように、立体相補性がある。それに加え、分子間相互作用においては、分子を構成する原子団の間で電気的性質が相補的に合う必要がある（静電的相補性）。また、生体内において標的分子であるタンパク質は水に取り囲まれている。化合物のアルキル基やベンゼン環などの疎水性官能基の周囲は、水分子が密な水素結合ネットワークを形成することで、動きの鈍いクラスターを構成している。この疎水性水和水は、タンパク質と医薬品化合物の疎水性官能基の周りに存在する。タンパク質と医薬品分子の疎水性相補性が合えば、水分子のクラスター構造は解放され、エントロピーが増大し、自由エネルギーが低下する。このように、標的分子と化合物間の相互作用には、立体相補性、静電的相補性、疎水的相補性の 3 つの相補性が存在し、そのうち 2 つの相補性を満たすものが有効な医薬品化合物になると考えられている。したがって、これら相補性に関わる化合物の原子団の空間配置（3次元ファーマコフォア）を決定することが、合理的な医薬品分子設計において重要である。

III-1-3. Structure-Based Drug Design と Ligand-Based Drug Design

3次元ファーマコフォアを決定し医薬品の分子設計を進める方法として、医薬品の標的分子（受容体などのタンパク質）が未知の場合には Ligand-Based Drug Design (LBDD)

の方法がとられる。一方で、標的分子が既知の場合には **Structure-Based Drug Design (SBDD)** の方法がとられる。**LBDD** は、標的分子の立体構造が得られていないため、**SBDD** に比べ合理的医薬品設計が難しいとされる。現在、リガンドとなる化合物の配座探索 [59]やその活性配座の効率的な抽出 [60] など、有効な手法が開発・研究されており、今後の創薬における展開が期待されている。**LBDD** で最も有効とされる方法では、同一のタンパク質に結合する化合物の立体構造を調べ、それらの原子団空間配置に共通する特徴を抽出して、3次元ファーマコフォアが決定される。

SBDD においては、相補性を満たすように化合物の原子団を配置して、医薬品分子を構築する。さらに、標的分子と化合物間の相互作用エネルギーを計算することで、できるだけ相互作用エネルギーの強い化合物を作りだすことができる。**SBDD** が実際の医薬品開発に貢献した例としては、**HIV** プロテアーゼ阻害薬であるネルフィナビル、分子標的治療薬であるイマチニブ、ゲフィチニブがある。イマチニブはフィラデルフィア染色体産物である **Bcr-Abl** を標的として、慢性骨髄性白血病などの適応を持つ。ゲフィチニブは、上皮成長因子受容体のチロシンキナーゼ阻害剤として非小細胞肺癌に奏功する。これらに加え、インフルエンザ特効薬として知られるノイラミニダーゼ阻害剤のオセルタミビルが標的タンパク質の立体構造に基づいて開発されている。

本節における計算研究では、**SBDD** の概念に基づいて医薬品の標的であるタンパク質の立体構造を予測している。次節に **SBDD** の対象であるタンパク質の立体構造と機能について、さらに、それを予測する際に有効な手段の一つである分子動力学シミュレーションについて述べる。

III-1-4. タンパク質の立体構造と機能

タンパク質の機能の多くは、特定の分子を認識し結合することで、触媒反応や輸送、情報伝達を行うことにある。この分子認識メカニズムは、分子表面での立体的な相補性と電気的な相補性に基づいて、「鍵と鍵穴」モデルで説明されてきた。特殊な形を持つ鍵穴（タンパク質の結合サイト）に、それに合う形を持つ鍵（分子）が入り込んで、強く結合することで複合体が形成されるという考え方である。

これまで、医薬品化合物の標的であるタンパク質は固い構造を持つと考えられていた。しかし、観測手段の高度化に伴い、タンパク質は本質的に柔らかい物質であり、その生物学的機能にはダイナミックな性質が大きく関与することが明らかになっている。このことは、多くのタンパク質がリガンドと結合する際に、柔軟に構造を変形させることで強く結合をすることを意味している。このリガンド分子の形に合わせて構造を変え、強い認識をするメカニズムは誘導適合 (**induced fit**) と呼ばれる。これにより、タンパク質の分子認識メカニズムは、「鍵と鍵穴」モデルの概念を基本として、誘導適合を考慮して説明されるようになった。

III-1-5. 分子動力学シミュレーションの歴史

分子動力学 (Molecular Dynamics; MD) シミュレーションは、1950 年代後半、Alder と Wainwright により「剛体球の分子動力学計算」として開発された。剛体球系では複数の粒子が存在するが、衝突するイベントを除けば粒子間に相互作用はなく直線運動をするだけであるため、時間刻みを決めてニュートンの運動方程式を解く必要がない。このように、当初の分子動力学計算は現在のものとは異なり、単純なシミュレーションとして始まったのだが、彼らの功績があったからこそ、その後の分子動力学法を大きく発展することとなった。

1960 年代から 1970 年代には、分子動力学法は質点型、剛体系、高速系へと拡張された。これらの方法論は現在の分子動力学計算においても用いられている方法である。さらに、1970 年には、分子動力学計算がタンパク質に応用され、Karplus と McCammon によって、ウシ膵臓トリプシン阻害剤の真空中 9.2 ps の分子動力学計算が行われた。彼らの業績により、それまでの「タンパク質は固い」という概念が覆され、「タンパク質は動的に系である」という概念が提唱された。彼らの業績を転機として、現在の生体高分子を対象とした分子動力学計算は発展を遂げることとなった。

1980 年以降は、温度、圧力、化学ポテンシャルを制御する方法が導入され、より実験系に近いシミュレーションが可能となった。これまでの分子動力学法は古典論に基づくものであったが、1985 年にはカー-パリネロ (Car-Parrinello) 法が発表され、量子論に基づくものも登場している。

III-1-6. 分子動力学計算の応用範囲

分子動力学計算は、X 線結晶構造解析や NMR における構造精密化や、タンパク質など生体内高分子の構造や動力学の予測などにおいて利用されている。まず、X 線や NMR では分子の電子密度や原子間距離といった情報を得ることができる。しかし、これらの分光法は原子位置を直接的に観測した結果ではないので、その電子密度や原子間距離と矛盾がないように原子を空間に配置するよう作業が必要となる。この時、分子動力学計算を用いた構造精密化により、化学的に妥当な結合距離や結合角を持つようにフィッティングが行われている。また、分子動力学計算が立体構造の予測を行う範囲としては、タンパク質およびペプチドの立体構造、タンパク質-リガンドの複合体構造、ペプチドのフォールディングなどがある。さらに、タンパク質の構造の揺らぎを予測することができるため、タンパク質の動的性質を予測する上でも有用である。本章における計算研究は、実験的に解明されていないタンパク質の立体構造を予測するために分子動力学法を利用している。分子動力学計算は古典力学に基づいており、ニュートンの運動方程式を解くことでタンパク質を構成する原子の座標を決定することができる。第 III-1-7 節以降には、分子動力学計算とニュートンの運動方程式について概説する。

III-1-7. 分子動力学計算

III-1-7-1. ニュートンの運動方程式

分子動力学計算とは、原子間に働く力と時間変異をニュートンの運動方程式を解くことで時間変化に対応した原子座標を予測する手法である。ニュートンの運動方程式（ニュートンの第二法則）は、原子を、質量を持つ粒子（質点）としてみなしている。質点を受ける力は、質量と位置の時間に関する 2 次微分の積、または質点と加速度の積として次式のように表される。

$$\mathbf{F}_i = m_i \frac{d^2 \mathbf{r}_i}{dt^2} = m_i \mathbf{a}_i$$

\mathbf{F}_i , m_i , \mathbf{r}_i , \mathbf{a}_i はそれぞれ、 i 番目の質点（質点 i ）が受け取る力、質点 i の質量、位置、加速度である。また、力、位置、加速度はベクトル量であり、質点 i が受ける力 \mathbf{F}_i は周りの質点から受ける力の合力として表される。質点にかかる力は、ポテンシャルエネルギーを与える関数である、分子力場から求めることができる。次に、エネルギーと力の関係を使うと、分子力場から力が求めることを示す。原子のエネルギー E_i と力 \mathbf{F}_i の関係は、次式のように表される。

$$\mathbf{F}_i = -\text{grad} E_i$$

ここで、grad（グラディエント）は勾配を表し、次式の関係がある。

$$\text{grad} = \mathbf{e}_x \frac{\partial}{\partial x_i} + \mathbf{e}_y \frac{\partial}{\partial y_i} + \mathbf{e}_z \frac{\partial}{\partial z_i}$$

\mathbf{e}_x , \mathbf{e}_y , \mathbf{e}_z は、 x , y , z 軸方向の単位ベクトルである。一般に、グラディエントはエネルギー局面の勾配として差分法で求められる。しかし、分子力場のエネルギー項は全て微分可能な関数であるため、エネルギー関数を微分した結果を用いれば力を求めることができる。

ここで、例として原子 i の結合エネルギー $E_{\text{bond}i}$ から原子にかかる結合の力 $\mathbf{F}_{\text{bond}i}$ を求める。原子 i と原子 j が結合距離 r で結合し、原子 i から原子 j に向かうベクトルを \mathbf{r}_{ij} とする。原子 i の結合エネルギーは $E_{\text{bond}i} = k_r(r - r_0)^2$ で表されるが（III-1-7-2. 分子力場参照）、これを r で微分すると、次式になる。

$$E_{\text{bond}i}/dr = 2k_r(r - r_0)$$

ベクトル \mathbf{r}_{ij} の単位ベクトルは \mathbf{r}_{ij}/r であるので、原子 i にかかる結合の力は次のように求めることができる。

$$\mathbf{F}_{\text{bond}i} = -2k_r(r - r_0) \frac{\mathbf{r}_{ij}}{r}$$

分子動力学計算では、時間変異の最小単位を時間刻み (time step)、各ステップの全原子の座標をつなぎ合わせたものを軌跡またはトラジェクトリ (trajectory) と呼ぶ。そして、計算の対象とする系を構成する全原子の座標をつなぎ合わせたものが立体構造として表される。タンパク質構造予測においては、1 ステップの立体構造のスナップショットをつなぎ合わせることで時系列に沿ったタンパク質の構造変化を得ることができる。

III-1-7-2.分子力場

分子動力学計算では、古典論に基づき、計算対象とする座標を関数に代入することでポテンシャルエネルギーを求めることができる。分子のポテンシャルエネルギーを与える関数とその係数を分子力場と呼ぶ。ポテンシャルエネルギー E は複数のエネルギーの和として表される。分子力場の種類により、扱うエネルギー項は異なるが、ここでは、本章における計算研究で用いた AMBER 分子力場 (AMBER 力場と略される) の表記を示す。

$$E = E_{\text{bond}} + E_{\text{angle}} + E_{\text{torsion}} + E_{\text{improper torsion}} + E_{\text{electrostatic}} + E_{\text{van der Waals}}$$

E_{bond} は結合長 r の関数、 E_{angle} は結合角 θ の関数で、 E_{torsion} と $E_{\text{improper torsion}}$ は、それぞれ二面角 ϕ と improper torsion φ のエネルギーである。 E_{bond} 、 E_{angle} 、 E_{torsion} 、 $E_{\text{improper torsion}}$ は原子間の結合に関する項で、結合項と呼ばれる。一方、 $E_{\text{electrostatic}}$ は静電エネルギーで、 $E_{\text{van der Waals}}$ はファンデルワールスエネルギーである。 $E_{\text{electrostatic}}$ 、 $E_{\text{van der Waals}}$ は結合の有無に関わらず生じる項であり、非結合項と呼ばれる。

E_{bond} は調和ポテンシャルとして、次式のように表される。

$$E_{\text{bond}} = k_r(r - r_0)^2$$

調和ポテンシャルとは、2 乗に比例するエネルギー関数をさす。ここで、 r_0 は平衡結合距離であり、 k_r は力の定数である。原子間距離が平衡結合距離に近づくほど安定で、平衡結合距離から離れるほど不安定であることを意味する。

E_{angle} は結合角 θ の関数であり、次式のように表される。

$$E_{\text{angle}} = k_{\theta}(\theta - \theta_0)^2$$

ここで、 θ_0 は平衡結合角であり、 k_{θ} は力の定数である。前式と同様に調和ポテンシャルとして表されるため、原子間の結合角が平衡結合角に近づくほど安定で、離れるほど不安定となる。平衡結合距離や平衡結合角は分子軌道計算による低分子の構造最適化や、X線や中性子線回折実験から決められている。また、結合や結合角のエネルギー定数については、分子軌道計算により構造最適化された構造を基準振動解析することで決められている。

E_{torsion} と $E_{\text{improper torsion}}$ は、それぞれ二面角 ϕ と improper torsion φ のエネルギーであり次式のように表される。

$$E_{\text{torsion}} = \frac{1}{2}v[1 + \cos(n - \gamma)]$$

$$E_{\text{improper torsion}} = \frac{1}{2}v_{\varphi}[1 + \cos(n\varphi - \gamma)]$$

v と v_{φ} はそれぞれ、二面角と improper torsion の定数である。 n は二面角を作る4原子の対称性を、 γ は位相を表している。この二式は、周期性があり回転ポテンシャルと呼ばれる。周期性は対称性と関係し、回転に対し2回対称であれば周期は1/2、3回対称であれば周期は1/3となる。二面角のパラメータは、量子化学計算により求められた回転ポテンシャルをフィッティングして決められている。

$E_{\text{electrostatic}}$ は静電エネルギーであり、電荷を持つ原子の相互作用を表している。

$$E_{\text{electrostatic}} = \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon r_{ij}}$$

$q_i q_j$ 、 $q_i q_j$ はそれぞれ原子 i, j の部分原子電荷、 ϵ は誘電率、 r_{ij} は原子 i, j 間の距離である。 $E_{\text{electrostatic}}$ には距離依存性があり、原子 i, j 間の符号が等しければ不安定な、符号が異なれば安定な相互作用となる。

計算系全体の静電エネルギーは、系を構成する全原子のペアに対する、クーロン・エネルギーのペアとして、次式で表される。

$$E_{\text{electrostatic}} = \sum_{i < j} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon r_{ij}}$$

静電エネルギーは、原子間距離の逆1乗のオーダーで減衰するが、距離に対する減衰が

遅いために、遠距離の相互作用も寄与する。ある原子から見て、至近距離の原子数よりも遠距離の原子数が膨大な数存在する。そのため、静電相互作用の計算のなかでも、遠距離の相互作用は計算に時間がかかる。計算系が大きくなるほど原子のペア数は膨大に増加するため、静電エネルギーの計算には多くの時間が必要となる。

ファンデルワールスエネルギー $E_{\text{van der Waals}}$ は 2 原子間の引力と斥力から生じ、次式で表される。

$$E_{\text{van der Waals}} = \frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6}$$

この式は、ファンデルワールス・ポテンシャル、もしくはレナード-ジョーンズ (Lennard-Jones) ・ポテンシャルと呼ばれる。右辺第一項はファンデルワールス斥力から生じる項であり、距離の逆 12 乗に比例する。対し、右辺の第二項はファンデルワールス引力から生じる項で、距離の逆 6 乗に比例する。

r_{ij} は原子 i, j 間の距離で、 A_{ij} , B_{ij} は係数で、それぞれ次のように表される。

$$\begin{aligned} A_{ij} &= (\varepsilon_i \varepsilon_j)^{1/2} (r_i + r_j)^{12} \\ B_{ij} &= 2(\varepsilon_i \varepsilon_j)^{1/2} (r_i + r_j)^6 \end{aligned}$$

ここで、 ε_i , ε_j はそれぞれ原子 i, j のファンデルワールスエネルギーの深さ、 r_i , r_j はそれぞれ原子 i, j のファンデルワールス半径である。 $E_{\text{van der Waals}}$ には距離依存性があり、原子間距離が非常に近い領域では距離の逆 12 乗に比例する斥力項が優位となり原子は反発しあう。原子間距離が大きくなると斥力項が減衰し始め、距離の逆 6 乗に比例する引力項の寄与が大きくなって、原子が引き合う。

計算系全体のファンデルワールスエネルギーも、次式のように系を構成する全原子のペアからの寄与の和で表される。

$$E_{\text{van der Waals}} = \sum_{i < j} \frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6}$$

ファンデルワールスエネルギーも系が大きくなるにつれ、原子のペア数が増加するため、計算に多くの時間が必要となる。しかし、ファンデルワールスエネルギーの計算は、距離の逆 1 乗に比例する静電相互作用の計算に比べて減衰が速いため、大きな問題とはならないとされる。

III-1-7-3.遠距離の静電相互作用の計算方法

分子動力学計算では、多くのエネルギーや力の項は分子力場で2体間の相互作用として定義される。そのため、原子数 N の2乗に比例して計算時間が増大する。第 III-1-7-2 節において、静電相互作用エネルギーの計算には多くの時間がかかるとした。計算時間を短縮するために多くの静電エネルギー計算が提案されているが、最も簡単な方法としてカットオフ (cut-off) 法がある。カットオフ法では原子のペア数を減らすために、ある原子から見てカットオフ距離以内のペアの静電相互作用のみを計算して遠距離の静電相互作用を0としている。しかし、カットオフ法で遠距離の静電相互作用を無視すれば、計算精度が低下することになる。カットオフ法以外の遠距離の静電相互作用の計算法としては、周期境界条件や Ewald 法などの高速計算アルゴリズムがある。次節から、周期境界条件、Ewald 法、Ewald 法を高速化させた Particle Mesh Ewald (PME) 法について順に示す。

III-1-7-4.周期境界条件

周期境界条件の基本的な考え方は、計算系に周期性を取り入れることで、実験系よりも取り扱う原子数が圧倒的に少なくてもマクロな系の性質を求めようとするものである。

周期境界条件では、計算対象を取り扱う際に周期的な箱 (セル) の中で分子を扱う。ここでは Figure III-1 に示すように、タンパク質や溶媒などを入れたセルの周りにイメージセルを配置する。セルには周期性があるため、分子がシミュレーション中に拡散してセルの下面に出たとしても、セルの上面に戻ることができる。周期境界条件の注意点としては、周期性があるために同一分子の離れた場所同士が相互作用してしまうことがある。これを防ぐために、セルの大きさを考慮して、溶質分子と境界の間に距離を取らせる必要がある。

III-1-7-5.Ewald 法

Ewald 法とは、周期境界条件で良く使われる静電相互作用の拘束計算法の一つである。Ewald 法では、系に周期性があることを利用して、エネルギーや力を級数展開する方法をとる。無限遠のイメージセルからの寄与を考慮することができるため、精度が高い。Ewald 法における周期境界条件下の静電相互作用は、次式で表される。

$$E_{\text{electrostatic}}(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \dots, \mathbf{r}_N) = \frac{1}{2} \sum_n \sum_i' \sum_j \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon[\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j + \mathbf{n}]}$$

ここでは、系は N 個の原子で構成されるとして、その原子 1 から N までの座標を $(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \dots, \mathbf{r}_N)$ とする。 q_i, q_j が原子 i, j の電荷、 ϵ が誘電率であり、 $\mathbf{r}_i, \mathbf{r}_j$ が原子 i, j の座

標である。 \sum_n' は、周期的なセルのベクトルの、 $\mathbf{n} = n_1 \mathbf{a}_1 + n_2 \mathbf{a}_2 + n_3 \mathbf{a}_3$ (n_1, n_2, n_3 は整数) の和であり、和をとる際に、 $i = j, \mathbf{n} = \mathbf{0}$ を除外することを意味する。前式は距離の逆 1 乗に比例するため収束が遅い。Ewald 法では、前式を次のようなエネルギー一項の和で表すことで、計算を高速化している。

$$E_{\text{electrostatic}}(\mathbf{r}_N) = E_{\text{real}} + E_{\text{wave}} + E_{\text{self}}$$

E_{real} は実空間、 E_{self} は波動関数、 E_{self} は自己のエネルギーであり、それぞれ次式で表される。

$$E_{\text{real}} = \frac{1}{2} \sum_n' \sum_i \sum_j \frac{q_i q_j \text{erfc}(\alpha |\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j + \mathbf{n}|)}{4\pi\epsilon |\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j + \mathbf{n}|}$$

$$E_{\text{wave}} = \frac{2\pi}{V} \sum_{\mathbf{m} \neq 0} \frac{\exp(-|\mathbf{m}|^2/4\alpha^2)}{|\mathbf{m}|^2} \sum_i \sum_j \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon} \cos[\mathbf{m} \cdot (\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j)]$$

$$E_{\text{self}} = - \sum_i \frac{q_i^2 \alpha}{4\pi\epsilon \sqrt{\pi}}$$

ここで、 $\text{erfc}()$ は補誤差関数であり、誤差関数 $\text{erf}(x) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^x \exp(-t^2) dt$ との間に

$\text{erfc}(x) = 1 - \text{erf}(x) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^\infty \exp(-t^2) dt$ の関係が成り立つ。 α は電荷の広がりを表す

パラメータで、 V は基本セルの体積、 \mathbf{m} は波動関数におけるセルのベクトル $\mathbf{m} = m_1 \mathbf{a}_1 + m_2 \mathbf{a}_2 + m_3 \mathbf{a}_3$ (m_1, m_2, m_3 は整数) である。このように、補誤差関数を使い収束の速い E_{real} の式と、収束の速い E_{wave} の式、さらに定数である E_{self} の式に分けたことで、静電相互作用計算の高速化が可能になる。 E_{real} の式の収束が速いため、実空間の計算にカットオフ法を用いても精度の低下はない。

III-1-7-6. Particle Mesh Ewald 法

PME 法は、Ewald 法の波動関数の式 E_{wave} を、電荷分布をグリッド上に内挿する形に書き換えて、高速フーリエ変換 (Fast Fourier Transform; FFT) することで計算を高速化させている。PME 法では Ewald 法における実空間のエネルギー E_{real} の式と自己エネルギー E_{self} の式はそのまま用いて、Ewald 法の波動関数 E_{wave} の式を次のように書き換えている。

$$\begin{aligned}
E_{\text{wave}} &= \frac{2\pi}{V} \sum_{\mathbf{m} \neq 0} \frac{\exp(-|\mathbf{m}|^2/4\alpha^2)}{|\mathbf{m}|^2} \sum_i \sum_j \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon} \cos[\mathbf{m} \cdot (\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j)] \\
&= \frac{1}{2\epsilon V} \sum_{\mathbf{m} \neq 0} \frac{\exp(-|\mathbf{m}|^2/4\alpha^2)}{|\mathbf{m}|^2} \sum_i q_i \exp(i\mathbf{m} \cdot \mathbf{r}_i) \sum_j q_j \exp(-i\mathbf{m} \cdot \mathbf{r}_j) \\
&= \frac{1}{2\epsilon V} \sum_{\mathbf{m} \neq 0} H(\mathbf{m}) S(\mathbf{m}) S(-\mathbf{m})
\end{aligned}$$

$S(\mathbf{m}) = \sum_i q_i \exp(i\mathbf{m} \cdot \mathbf{r}_i)$ は構造因子と呼ばれ、電荷密度のフーリエ変換に対応する。 \mathbf{u} を、セルを分割してできた格子点の位置ベクトルとし、 $\exp(i\mathbf{m} \cdot \mathbf{u})$ のフーリエ級数展開の形にすると次式のようにになる。

$$S(\mathbf{m}) = \sum_{k_1=0}^{K_1-1} \sum_{k_2=0}^{K_2-1} \sum_{k_3=0}^{K_3-1} Q(k_1, k_2, k_3) \exp \left[2\pi i \left(\frac{m_1 k_1}{K_1} + \frac{m_2 k_2}{K_2} + \frac{m_3 k_3}{K_3} \right) \right]$$

$Q(k_1, k_2, k_3)$ はグリッド点に内装された電荷である。電荷に近い格子点ほど大きな値が割り振られている。 $S(\mathbf{m})$ の式により高速フーリエ変換が可能となり、計算が高速化される。静電相互作用の計算は原子数 N の 2 乗に比例するが、PME 法により $N \log N$ にまで短縮することが可能である。

III-1-7-7. SHAKE

計算時間の短縮や、分子の立体構造に何らかの条件を加えて計算を行うことを目的として、様々な束縛法（または拘束法）が用いられている。SHAKE は、原子間距離を一定値（標準値）に束縛する方法の一つである。通常、水素原子と重原子の結合距離や、水素原子-水素原子間の原子間距離の束縛に用いられる。束縛の対象には、水分子を含め計算系の全原子が対象となる。

水素結合が関係する運動は高速運動であり、この運動を計算するためには時間刻みを短くする必要がある。しかし、時間刻みを短くすると計算時間が長くなり、時間刻みを長くすると計算が破たんする可能性がある。SHAKE では原子間距離を一定値に束縛し、ユニット化することで高速運動を考えなくても良いようにしている。

III-1-8. ドッキング [57,61]

ドッキングは、タンパク質の立体構造に対し、化合物を計算機上で結合させて、その複合体構造と結合エネルギーを予測する方法である。分子を標的タンパク質表面に配置し、結合エネルギーを計算する操作は、数十万回から数百万回行われ、最も良いスコア（結合エネルギー）の構造が複合体モデルとして出力される。以下にドッキングの手順

を概説する。

ドッキングの第一段階として、まず、標的分子構造の原子座標が必要となる。多くの場合、この原子座標は X 線結晶構造解析により得られたものが利用される。NMR 解析やホモロジーモデリングにより得られた座標が用いられる場合もあるが、一般に精度が低いとされており、慎重に評価する必要がある。得られた原子座標が X 線結晶構造解析で得られたものである場合、水素原子の位置を推定する必要がある。多くの水素原子の位置は、隣接する非水素原子の位置に基づいて幾何学的に計算することができる。しかし、ヒドロキシル基などの水素原子は幾何学的に計算することができないので、適当な位置に水素原子を配置させたあと、構造最適化を行う必要がある。

第二段階として、得られた標的分子の原子座標から、リガンドの結合部位を決める必要がある。適当なリガンド分子を標的分子の複合体構造が X 線結晶構造解析に得られていて、結合部位が明らかな場合には、その情報を活用することができる。もし、複合体構造が得られていない場合には、結合部位を予測する必要がある。

第三段階として、標的部位の結合部位に適したリガンド分子の立体配座を推定する必要がある。リガンド分子は、標的分子に結合したとき、非常に不安定な配座をとることはできない。しかし、標的分子に結合することで、ある程度安定化されるので、最安定な立体配座である必要はないとされる。リガンドが標的分子に結合した際にどのような立体配座をとるか予測することは難しいとされている。

第四段階として、立体配座が得られたリガンド分子を標的分子の結合部位に配置して、結合部位でのリガンド分子の構造最適化を行う。この操作が「ドッキング」である。構造最適化においては、分子力場計算によってリガンドのひずみエネルギーと、標的分子とリガンド分子間の相互作用エネルギーを極小化する。ここで、結合部位との相互作用が不利であった場合には、リガンド分子は結合部位に結合できずに結合部位の外に出されてしまう。ドッキングでは、リガンド分子だけでなく標的分子の構造最適化も同時に行われることもある。

最終段階として、ドッキングの結果に対して評価を行う。標的分子をリガンドの結合親和性を評価するために、結合に伴う自由エネルギー変化を計算する必要がある。しかし、エントロピー項の計算が事実上できないことや水や対イオンの影響を見積もれないこと、ポテンシャル関数に不確かさがあることなどの理由から、自由エネルギー変化を正確に求めることができない。また、ドッキングでは用いる標的分子の構造の正確さに大きく依存するため、適切な系に十分注意して計算をすることが求められている。

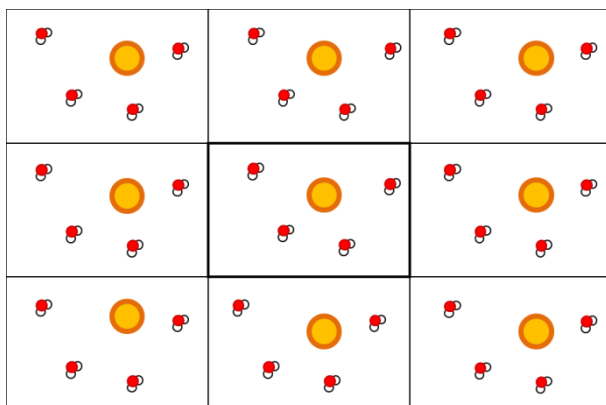


Figure III-1-1. 周期境界条件の模式図。黄色い球がタンパク質で、赤と白の球が水分子である。中心部に基本セルが存在し、その周囲にイメージセルが配置されている。

III-2. Cytochrome P450 とは

シトクロム P450 (CYP) は、自然界に広く存在する、ヘム含有スーパーファミリーの総称である [62]。その機能は、生理活性物質の生成や変異原性物質の代謝活性化、外因性化学物質の解毒代謝など、生体内恒常性の維持に重要な役割を担っている [63–65]。CYP により生合成される生理活性物質には、ステロイド、脂肪酸、脂溶性ビタミン、エイコサノイドなどが含まれており、生体内機能を維持する上でなくてはならない酵素として認識されている。それだけでなく、CYP は薬物代謝において最も寄与の大きい酵素として、薬物治療において重要視されている [64,65]。薬物の代謝は、phase I (酸化、還元、水酸化反応) と phase II (抱合反応) の大きく二相に分けられる。CYP は phase I の酸化反応において、分子状酸素を利用して薬物の一原子酸素添加反応を触媒している。

III-2-1. CYP の遺伝子多型

CYP が薬物代謝に寄与する割合は高く、Williams らによる報告によれば、2002 年にアメリカの臨床で使用された上位 200 種類の薬剤のうち 4 分の 3 が CYP による代謝を受けるとされる [66]。そのため、CYP の遺伝子多型は薬物の体内動態における個人差の原因の一つとして問題視されている [67,68]。遺伝子変異が薬物の臨床使用に与える影響として、CYP の酵素機能が低下した場合には、クリアランスの減少や薬物血漿中濃度の増加が引き起こされる。また、薬物の血漿中濃度の上昇により、用量依存的に薬物の毒性が発現することもありうる。逆に、酵素機能が亢進した場合には、薬効の低下により、効率的な薬物治療が妨げられることが考えられる。また、代謝活性化を受ける薬剤を投与された場合にも、期待される薬効は得られない。代謝物代謝に大きく寄与する CYP の中で、特に遺伝子多型が問題視されているものには、CYP2C9、2C19、CYP2D6、CYP3A4/5 などがある [68,69]。それらに加え、CYP1A2 もまた重要な薬物代謝酵素であり、多くの遺伝子多型が存在する。

III-2-2. CYP1A2 の遺伝子多型

CYP1A2 は、臨床で使用される薬物のうち 8.9 % の代謝に関与するとされる [68]。CYP1A2 が代謝する薬物には、喘息治療薬 (テオフィリン) や抗精神病薬 (アミトリプチリン、イミプラミン、オランザピン)、抗不整脈薬 (メキシレチン、プロプラノロール) などが薬物治療において重要なものが多く含まれる。CYP1A2 の遺伝子多型は、これまでに 40 種類のバリエーションが知られており [30]、その遺伝子多型はこれらの薬物の体内動態に影響を及ぼす可能性がある。CYP1A2 は、様々な化合物により誘導を受けることが知られており [70]、その中でも、タバコの煙に含まれる多環芳香族炭化水素による誘導が注目されている [71]。そのため、喫煙者を対象に転写調節領域における遺伝子多型が盛んに検討された。有名なものとして、3860G>A (CYP1A2*1C) は 5' 上流の一

塩基多型であり、誘導の低下により、日本人の喫煙者におけるカフェインの脱メチル化活性の低下が報告されている [31]。また、-163C>A (*CYP1A2*1F*) はイントロン 1 における変異であり、ドイツ人 [32] において誘導が上昇していることが報告されている。一方で、エキソン領域における遺伝子多型はこれまでに 20 種類が報告されており、タンパク質構造にアミノ酸置換を伴う。しかし、いずれもアレル頻度が 1 % 未満と低く、*in vivo* での研究が難しい。*in vitro* 研究では、これまでに複数の研究グループがその酵素活性の評価しており、アミノ酸置換を伴ういくつかのバリエーションで酵素活性が変化していることが明らかにされている [33–35]。これらの *in vitro* 研究は実験条件が統一されておらず、厳密な比較ができないという問題点があったが、その後、本節における研究の共同研究者である伊藤らにより統一的な条件下でその酵素活性が評価されている [36]。

III-2-3. CYP の構造

CYP の全体構造は、 β シートに富む領域と α ヘリックスに富む領域で構成されている [72] (Figure III-2-3-1)。活性中心のヘムは分子のほぼ中央に位置し、溶媒には直接接していない。そして、ヘム鉄の第五配位子の Cys チオレートがヘムから見て近位表面 (proximal surface) に位置し、Cys から C 末端に続くループが硫黄原子を取り囲むように存在している。また、ヘムの近位表面には塩基性残基が多く存在する。さらに、CYP の全体構造を横切るように長い I ヘリックスが存在している。I ヘリックスにはかぶさるように F、G ヘリックスが存在する。これらの領域は生物種に関わらず共通しており、“P450 基本構造” (P450-fold) と呼ばれる。CYP の一次配列においても、分子種間で共通する配列が存在することが知られている。中でも最も保存された領域がヘム結合ドメイン (heme-binding domain) である [73–75]。このヘム結合ドメインは、第五配位子の Cys 周辺のアミノ酸配列 (FXXGERXCXG) として、最も保存されている [75]。さらに、ミクロソーム型 CYP では小胞体膜に結合する領域から 30~40 残基後に Pro に富む領域 (proline-rich region) がある [72]。この領域は CYP 三次構造のフォールディングに関与すると考えられている [76]。

CYP は多様な基質を代謝することが知られているが、その触媒反応は基質結合部位の構造で決まると考えられている。後藤らは CYP の一次配列を比較することで、基質認識において共通するアミノ酸配列が存在することを示している [73]。これらのアミノ酸配列は SRS-1~6 (Substrate Recognition Site) と呼ばれ、X 線結晶構造解析により明らかにされた CYP の立体構造において確かめられている。特に、B'ヘリックスとその周辺、Fヘリックスの C 末端側、Gヘリックスの N 末端側などにおいて対応が見られている。また、B'ヘリックス、Fヘリックスと Gヘリックスをつなぐループ (FG ループ) は温度因子が高く、構造的揺らぎが大きな領域であることが分かっている [72]。これらの部位は基質認識、基質の結合の際の構造変化に関与すると考えられている。

実験的に CYP タンパク質が構造柔軟性を持つことが示された例として、CYP2B4 の X 線結晶構造解析の結果が挙げられる。Scott らは、CYP2B4 の基質非結合型の結晶構造と、4-(4-chlorophenyl)imidazole が結合した結晶構造について比較を行った結果、B' から C ヘリックスと F から G ヘリックスにおいて構造的差異が存在することを報告している [77,78]。彼らの研究によれば、基質非結合型 CYP2B4 は“開いた構造”をとっているのに対し [77]、リガンドが結合した構造は“閉じた構造”をとっている [78]。彼らの研究は、CYP タンパク質の立体構造はリガンドの結合により構造的変化が引き起こされることを示唆している。このような構造変化を示した X 線結晶構造解析の結果は、哺乳類の CYP [77-81] だけでなくバクテリアの CYP [82-85] においても共通して確認されている。

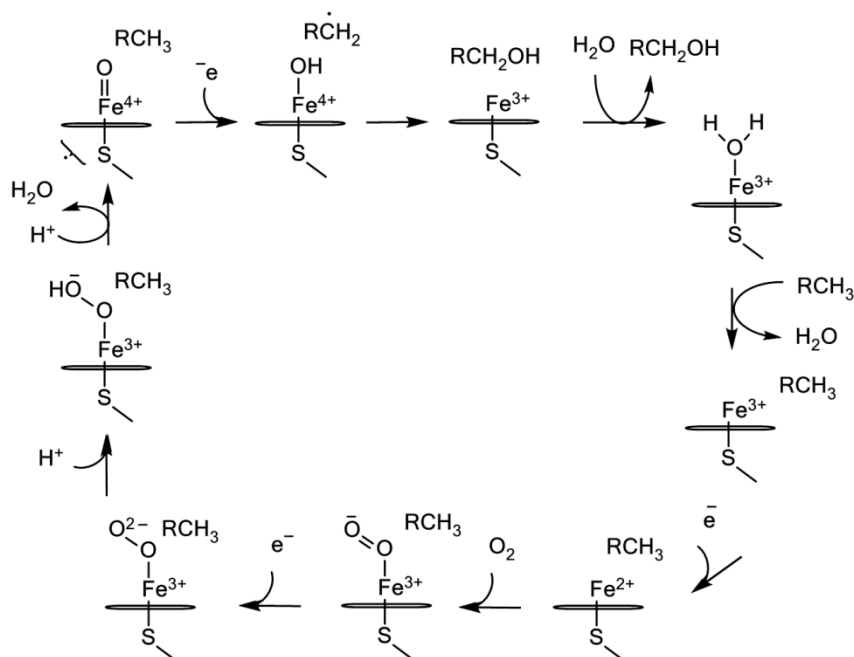


Figure III-2-3-1. Overall structure of CYP1A2 determined by X-ray crystal analysis [37]

III-2-4. CYP の触媒サイクル

大部分の CYP は分子状酸素から 1 原子の酸素を基質に添加する、一原子酸素添加反応を触媒する。この反応は、基質と分子状酸素に加え、ヘム鉄を還元するためにシトクロム P450 レドックスパートナーから電子の供給を受ける必要がある [86]。

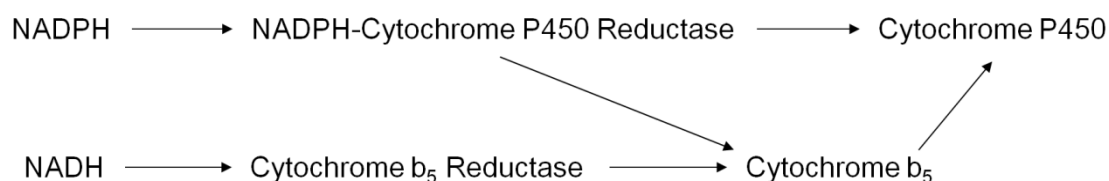
CYP の触媒サイクル [87]の簡略図を Scheme III-2-1 に示す。



Scheme III-2-1. Catalytic cycle of monooxygenation by CYP. [87]

触媒サイクルは **CYP** (Fe^{3+}) に基質 (**RH**) が結合することで開始反応が始まる。基質との複合体が形成されることで、第六配位子である水分子がへム鉄 (Fe^{3+}) から解離し、へム鉄の電子状態がロースピンからハイスピンの状態へと切り替わる。この時、へムの酸化還元電位が上がり、電子を受け取りやすくなる。次に、電子供与体から電子 1 つが渡されて、還元型のへム鉄 (Fe^{2+}) と基質との複合体 ($\text{Fe}^{2+}\text{-RH}$) が形成される。この還元型のへムに対し、すぐに分子状酸素 (O_2) が結合して三者複合体 ($\text{O}_2\text{-Fe}^{2+}\text{-RH}$) が形成される。この三者複合体はオキシ体と呼ばれ、 Fe^{2+} の状態から Fe^{3+} の状態へと自動酸化を起こす。続いて、この三者複合体が 2 個目の電子を受け取ると、複合体内で分子状酸素の活性化が起こる。このとき、 $\text{Fe}^{3+}\text{-O-O-H}$ を経て酸化活性種である O=Fe^{4+} ポルフィリン π -カチオンラジカルが形成されると考えられている。その後、基質に酸素が添加されると、生成物 (**ROH**) と水が解離し、へムは休止状態 (Fe^{3+} 、ロースピン) に戻る。このように、一原子酸素添加反応においては、二電子還元とそれに伴うプロトン移動が必要である。多くの場合、この二電子は還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリソリン酸 (Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate; NADPH_2) に由来することが多いが、**P450cam** のようなバクテリア **CYP** では、還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide; NADH_2) が利用される場合もある。

CYP の還元系は、複数存在することが知られているが [88]、ここでは、真核細胞の小胞体における電子の流れを Scheme III-2-2 に示す。



Scheme III-2-2. Electron transfer to microsomal cytochrome P450 [88].

NADPH からの経路では、電子は NADPH-シトクロム P450 還元酵素（Cytochrome P450 Reductase）を経由して CYP へと渡される。一方で、NADH からの経路では、シトクロム b_5 還元酵素（Cytochrome b_5 Reductase）からシトクロム b_5 （Cytochrome b_5 ）を経由して CYP へと渡される。さらに、この二つの電子伝達経路は互いに交差しあい、NADPH-シトクロム P450 還元酵素からシトクロム b_5 、シトクロム b_5 から CYP への電子の流れも存在する。CYP はこれらレドックスパートナーと同じ部位で結合して電子を受け取るとされる。CYP とそのレドックスパートナーとの結合部位は、これまでに実験研究や計算研究により検討がなされている [89–92]。Chang らは、CYP2B4 のレドックスパートナーとの結合部位を、遺伝的アルゴリズムを用いた計算研究により予測し[89]、その予測結果は Bridges らにより実験的に検証されている [90]。彼らの結果によれば、その結合部位はヘムのポルフィリン環平面近くの（基質結合部位とは反対側）、KL ループ、C ヘリックス、L ヘリックスに囲まれた領域であるとされる。この予想された結合部位には Lys や Arg のような塩基性残基が複数存在しており、CYP とレドックスパートナーとの間に塩橋を形成し、分子内電子伝達において機能すると考えられている [91,92]。

CYP の触媒サイクルの調節において、水分子は重要な役割を担うと考えられている [86]。多くの CYP において、水分子はヘムの第六配位子として機能し、ヘムを不活性化することで“休止状態”に留めている。基質が活性部位に結合し、基質とヘムの距離が近づくと、CYP タンパク質は誘導適合と呼ばれる構造変化を引き起こし、複合体構造へと変化する。基質の結合は、タンパク質の構造変化と同時にヘムの電子状態も切り替える。ヘムは不活性な状態では、水分分子が結合することで六配位の五重項状態（ロー спин）を保っている。基質の結合は、ヘム鉄から水分子が解離させることで、鉄の電子状態を活性の高い五配位の六重項状態（ハイスピン）に切り替える。また、活性部位の水分子には、ヘムの電子状態の調節以外にも機能があることが示唆されている。P450-BM3 の結晶構造解析の結果から、P450-BM3 の活性部位には複数の水分子が存在することが報告されており、水酸化反応におけるプロトン移動の役割があると考えられている [93]。また、P450cam とその基質である camphor との複合体の結晶構造解析の結果からは、P450cam のいくつかの残基と水分子が水素結合ネットワークを形成している

ことが明らかになっている [94]。さらに、P450cam による camphor の水酸化反応については、Parasad らが NMR を用いて camphor に付加された水素原子が溶媒の水分子に由来することを確認している [95]。バクテリア CYP に限らず、哺乳類 CYP の結晶構造においても活性部位に水分子が存在するものがあり、CYP2C19 (PDB ID: 4GQS) や CYP3A4 (PDB ID: 4I3Q) などがその例である。このように水分子が CYP の活性部位に存在し、何らかの役割を持っていることは強く示唆されているが、水分子は小さく可動性が高いため、実験的にその機能を調べることは難しいとされている。

III-3. 分子動力学計算を用いた遺伝子変異型シトクロム P450 1A2 の三次構造及び構造柔軟性の予測

III-3-1. 序

CYP1A2 は重要な薬物代謝酵素の一つとして認識されており、これまでに遺伝子変異型 CYP1A2 の酵素活性を評価した実験研究が複数の研究グループにより行われている [33–35]。彼らは異なる実験条件下で検討を行っていたため、遺伝子変異型 CYP1A2 の酵素活性を厳密に比較することはできなかったが、その後、伊藤らによって、アミノ酸変異を伴う遺伝子変異型 CYP1A2 について、統一的な条件下、その酵素活性が評価された [36]。

近年、CYP の三次構造におけるアミノ酸置換の影響が、計算化学的手法を用いて研究されている [96–105]。小田らは CYP2C19 の野生型と遺伝子変異型の立体構造をホモロジーモデリングと分子動力学計算 (MD) シミュレーションにより予測している [96]。彼らの計算結果によれば、野生型 CYP2C19 で、基質である (S)-メフェニトインとアミノ酸残基との間に水素結合が形成されるが、変異型 CYP2C19 においてはこの水素結合が形成されなかった。また、小林らによって、CYP2B6 における一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism; SNIP) の影響をドッキングと MD シミュレーションを用いて検討している [97]。彼らの計算結果からは、遺伝子変異型 CYP2B6 は 1 つのアミノ酸残基の置換により立体構造だけでなく、構造柔軟性においても野生型 CYP2B6 とは差異が存在することが示唆された。これら立体構造と構造柔軟性の差異を原因として、遺伝子変異型 CYP2B6 では野生型 CYP2B6 の基質である artemether が認識できなくなっている可能性があることが示された。CYP1A2 の遺伝子多型に関しては、CYP1A2.11 の変異である Phe186Leu について計算研究がなされている [98]。Phe186Leu は、野生型 CYP1A2 の触媒部位からは離れた位置に存在する変異である。Zhang らは、Phe186Leu が CYP1A2.11 の酵素活性に及ぼす影響を 20 ns の MD シミュレーションにより検討している。彼らの計算結果は、Phe186Leu はタンパク質の柔軟性と動きを変化させ、基質の触媒部位への通り道をほとんど閉じた状態にしてしまう可能性があることを示した。これまでに、遺伝子変異型 CYP1A2 の立体構造は実験的に解明されておらず、CYP1A2.11 の立体構造だけが計算的手法により予想されているにすぎない。CYP1A2.11 を除いたアミノ酸置換を伴う遺伝子変異型 CYP1A2 に関しては、その酵素活性が野生型とは異なる原因が未だ説明されていない。

本節における研究では、遺伝子変異が CYP1A2 の立体構造と構造柔軟性に及ぼす影響を、MD シミュレーションを用いて検討した。研究対象とした野生型および遺伝子変異型 CYP1A2 の酵素活性は、以前に伊藤らによって決定された酵素活性 [36] を参考とした。本節における研究で行った MD シミュレーションは 100 ns を超えており、従来の CYP を対象とした計算研究より長時間なものとなる [95–104]。長時間の計算研究を

行うことで、CYP の動的な性質を予測できると期待される。CYP の動的性質はその酵素機能にとって重要であることから、この研究で得られた結果は CYP の代謝メカニズムの理解につながることを考えられる。また、本節における研究から得られた、タンパク質構造や機能の予測は構造に基づく医薬品設計 (Structural-based drug design: SBDD) の発展に役立つと期待される [106,107]。

III-3-2. 方法

本節における研究で用いた野生型および遺伝子変異型 CYP1A2 を Table 1 に示す。加えて、Table 1 には、アミノ酸残基の置換と、伊藤らによって決定された酵素活性 [36]、MD シミュレーションを行った時間を合わせて示した。

Table III-3-1. Wild-type and mutant CYP1A2 used in the current study and the experimentally determined enzymatic activities [36].

Gene	Protein	Mutation	Activity ^{a)}	Time/ns ^{c)}
CYP1A2*1	CYP1A2.1	—	Normal	100
CYP1A2*4	CYP1A2.4	Ile386Phe	N. D. ^{b)}	100
CYP1A2*6	CYP1A2.6	Arg431Trp	N. D. ^{b)}	100
CYP1A2*8	CYP1A2.8	Arg456His	N. D. ^{b)}	175
CYP1A2*11	CYP1A2.11	Phe186Leu	Decreased	175
CYP1A2*13	CYP1A2.13	Gly299Ser	Normal	100
CYP1A2*14	CYP1A2.14	Thr438Ile	Increased	100
CYP1A2*15	CYP1A2.15	Pro42Arg	Decreased	150
CYP1A2*16	CYP1A2.16	Arg377Gln	N. D. ^{b)}	150

a) 7-ethoxyresorufin *O*-deethylation activities

b) not detectable

c) time taken

野生型 CYP1A2 (CYP1A2.1) の構造は、実験的に解明され Protein Data Bank に登録された構造 (PDB ID: 2HI4) を基に作成した [37]。CYP1A2 の結晶構造に関しては、2HI4 はこれまでに Protein Data Bank に登録されている唯一の構造である。2HI4 は N 末端の膜結合ドメインを除く Arg34 から Arg503 までの残基が 1.6 Å の分解能で観測されている。2HI4 は阻害剤である α -ナフトフラボン (ANF) との複合体でありリガンド結合によるコンフォメーション変化が構造中に含まれる可能性がある。そこで、まず結晶構造に含まれる結晶水と ANF を全て除いたものを CYP1A2.1 の初期構造として、構造最適化を行った。続いて、昇温 MD シミュレーションと 100 ns の MD シミュレーションを行った。8 種類の遺伝子変異型 CYP1A2 の初期構造は、MD シミュレーション後に構造

最適化した CYP1A2.1 の構造を基に作成した。

それぞれのタンパク質について、少なくとも 100 ns 以上の MD シミュレーションを行った。昇温シミュレーションは 20 ps 行い、その間、温度を 0 K から 300 K に上昇させた。それから平衡状態の MD シミュレーションを 300 K、定圧下で行った。系を TIP3P モデルで溶媒和し、周期境界条件を用いて計算を行った。周期境界はタンパク質表面から少なくとも 8 Å の幅をもたせた。van der Waals 力の cut off 距離は 10 Å とし、静電的相互作用の計算には Particle Mesh Ewald 法を使用した。系を中性にするため塩化物イオンを配置した。ヘム鉄周辺のパラメータには、小田らにより決定されたパラメータを使用した [108]。このヘム鉄の状態は、五配位の六重項状態の鉄(III)を表しており、CYP が基質を認識して、触媒反応が引き起こされる時の状態に対応している。ヘム鉄以外の領域には Giammona らによって決定されたパラメータを使用した。最適化と MD シミュレーションには AMBER ff12SB 力場を用いた [109]。AmberTools の tleap を用いて水素原子を添加し、遺伝子変異型 CYP1A2 の初期構造を作成した。全ての MD シミュレーションのタイムステップは 2 fs とした。水素原子による結合の伸縮を制限するために SHAKE アルゴリズムを使用した。

MD シミュレーションにより計算された野生型・遺伝子変異型 CYP1A2 の立体構造を評価するため、MD トラジェクトリに沿ってペプチド主鎖の root mean square deviations (RMSDs) を計算した。RMSD 計算の参照構造には、昇温 MD シミュレーション後の構造を用いた。アミノ酸残基の柔軟性を評価するためにペプチド主鎖の C α 原子に対して Root mean square fluctuations (RMSFs) を計算した。RMSF 計算の参照構造には、MD トラジェクトリのうち最後の 10 ns の平均構造を用いた。RMSD と RMSF の計算には AmberTools12 の cpptraj を使用した。

III-3-3. 結果と考察

CYP1A2.1 については 100 ns の MD シミュレーションを行った。その RMSD を Figure III-3-1A に示す。CYP1A2.1 の RMSD は 60 ns の MD シミュレーション以降、収束していることから、CYP1A2.1 の立体構造は 100 ns の MD シミュレーションにより平衡構造が得られたものと考えられた。CYP1A2.1 の MD シミュレーション後の最適化構造を Figure III-3-2 に示す。

CYP1A2.4、CYP1A2.6、CYP1A2.13、CYP1A2.14 についても 100 ns の MD シミュレーションによりその RMSD が収束しているため、平衡構造が得られたと考えられた。一方で、CYP1A2.8、CYP1A2.11、CYP1A2.15、CYP1A2.16 については、RMSD が収束するまでに 100 ns 以上の時間を要し (Table III-3-1)、これらの変異体におけるアミノ酸置換は全体構造に与える影響が大きいことが示唆された。ここで、各変異体の立体構造において、CYP1A2.6、CYP1A2.11、CYP1A2.13、CYP1A2.14、CYP1A2.15 の変異は活性部位から離れた位置に存在するが、CYP1A2.4、CYP1A2.8、CYP1A2.16 の変異は比較

的へムから近い位置に存在することがわかっている (Figure III-3-3 and III-3-4)。このことから、遺伝子変異が全体構造に与える影響はアミノ酸置換があった位置に依存しない、ということが考えられる。

CYP1A2.8 に対し 175 ns の MD シミュレーションを行った。その RMSD を Figure III-3-1B に示す。100~145 ns の間に、RMSD が過渡的に上昇している。CYP1A2.8 の RMSD は他の変異体の RMSD に比べさほど大きいというわけではない。この RMSD の結果から、100~145 ns の間、一時的に RMSD が上昇した瞬間には CYP1A2.8 の準安定状態が存在しているのではないかと予想された。この予想を検証するために、CYP1A2.8 について、300 ns の MD シミュレーションを行った。その 300 ns の MD トラジェクトリを用いて、RMSD を計算したところ、200~250 ns において、再び一時的に RMSD の数値が上昇した (Figure III-3-5)。これらの結果から、175 ns と 300 ns の MD シミュレーションを行った二つの結果に矛盾はないこと、CYP1A2.8 の立体構造を予測するには 175 ns の MD シミュレーションで十分であることが示唆された。CYP1A2.8 の活性低下の原因の一つとして、触媒反応に不利な準安定状態が存在するからではないかと考えられた。しかし、300 ns の MD シミュレーションだけでは、CYP1A2.8 の RMSD がまだ収束していないという可能性も残されている。いずれにせよ、これらの結果は CYP1A2.8 の変異 (Arg456His) が全体構造に大きな影響を及ぼすことを示唆している。

CYP の全体構造の中で、I ヘリックスの中心付近には多くの種で保存された Thr が存在する [72]。CYP1A2 と ANF の結晶構造においては Thr320 がその保存された残基である。この結晶構造と計算により予測された基質非結合型 CYP1A2 の立体構造における違いはほとんど見られなかったが (Figure III-3-6A)、活性部位周辺の I ヘリックスにおいて構造的差異が存在した。結晶構造において I ヘリックスはまっすぐな α ヘリックスを形成しているが、計算により予想された基質非結合型 CYP1A2 においては、I ヘリックスが部分的にループを形成していた (Figure III-3-6B)。このループは Asp320 と Thr321 の間に位置している。I ヘリックスは活性部位を構成する部分構造のひとつであり、基質認識に関与すると考えられている [73]。結晶構造においては Asp320 の近くに Gly316 が存在していて、結晶水を介して ANF と水素結合を形成している可能性が示唆されている [37]。この水分子が介した水素結合は基質の結合による構造変化の一つであり、リガンド結合型とリガンド非結合型構造における重要な構造的差異の一つであると考えられた。

CYP1A2.1 の RMSF を Figure III-3-7 に示す。CYP1A2.1 の RMSF において、N 末端を除けば CD ループの Ser156、FG ループの Pro246、HI ループの Gly299 において数値が高い。CYP1A2 の結晶構造においては、BC ループ、F ヘリックス、I ヘリックスが活性部位を囲んでいて、ANF との相互作用に関与していると考えられている [37]。また、これら部分構造は、後藤により提唱された SRS に含まれる部分構造でもあり [73]、基質認識に関与すると考えられている。RMSF において数値の高かった FG ループと HI ル

ープは、それぞれ F ヘリックス、I ヘリックスに続くループである。これらの構造柔軟性は、基質の結合による構造変化や基質認識において重要な役割を持つと考えられる。また、CD ループはヘムのポルフィリン環と相互作用する C ヘリックスに続くループである。そのため、CD ループの構造柔軟性は C ヘリックスの構造に影響を及ぼすことで、ヘムの触媒機能にも影響する可能性があると考えられる。

いくつかの遺伝子変異型 CYP1A2 の RMSF は野生型とは異なる特徴を示した。野生型と遺伝子変異型 CYP1A2 の RMSF の重ね合わせを Figure III-3-8 に示す。CYP1A2.1 の RMSF と比較すると、CYP1A2.4 と CYP1A2.6 では、CD ループの構造柔軟性において差異が見られた (Figure III-3-8A and III-3-8B)。CYP1A2.4 と CYP1A2.6 の変異はそれぞれ Ile386Phe と Arg431Trp で、どちらも KL ループの存在している (Figure III-3-8B and III-3-8D)。CYP1A2.1 と CYP1A2.4 との RMSF の差は、CD ループの Ser156 において 0.68 Å であった。一方で、CYP1A2.6 との RMSF の差は CD ループの Ser156 において 0.81 Å であった。さらに、CYP1A2.4 と CYP1A2.6 の立体構造は、どちらも C ヘリックスがヘムに近づくような構造をとり CYP1A2.1 と比べて構造的差異が見られた (Figure III-3-9)。CYP1A2.4 と CYP1A2.6 における、CD ループの構造柔軟性と C ヘリックスの位置は、ヘムの環境を変えてその触媒活性を変化させた可能性がある。

CYP1A2.8 の RMSF は BC ループの Gly102 において、CYP1A2.1 より 1.31 Å 高く、H ヘリックスの Lys292 においても 0.85 Å 高かった (Figure III-3-8C)。BC ループは基質認識に関与すると考えられており [73]、BC ループにおける構造柔軟性の違いは CYP1A2.8 の触媒機能に影響を及ぼす可能性がある。CYP1A2.8 の変異である Arg456His は L ヘリックス近くの KL ループに位置しており、BC ループからは空間的に距離がある (Figure III-3-3C and III-3-4F)。この結果は、Arg456His の変異が、遠く離れた BC ループにおける基質認識に影響を及ぼす可能性があることを示唆している。

CYP1A2.11 の変異は DE ループの Phe186Leu である (Fig. III-3-3D)。CYP1A2.11 の RMSF は、FG ループのほぼ中央に位置する Lys221 において、CYP1A2.1 より 0.73 Å 高かった (Fig. III-3-8D)。CYP1A2 の結晶構造において、F ヘリックスの Phe226 は ANF と π - π スタッキングにより相互作用しており、基質認識に関与している可能性がある [73]。CYP1A2.11 は活性の低下が報告された変異体である。MD シミュレーションの結果から、CYP1A2.11 の活性低下の原因は、F ヘリックス周辺の構造柔軟性の低下により基質との親和性が低下したからではないかと考えられた。それに加え、F ヘリックスは、計算研究の結果から基質の通り道を形成していると考えられており [110]、特に Lys221 はその入り口に相当する場所のすぐ近くに位置している。実験研究の結果から、CYP1A2.11 には基質特異性があることが報告されており、7-エトキシレゾルフィンに対する活性 (野生型に対して 24 %) がフェナセチンに対する活性 (野生型に対して 8 %) よりも 3 倍高いとされる [36]。この基質特異性の原因は、本節における基質非結合型構造の予測だけでは得ることができなかった。基質特異性の原因について探るためには、

その基質認識について理解する必要があると考えられる。野生型と遺伝子変異体における基質認識の違いについては、第 III-5 節において、MD シミュレーションとドッキングにより基質との複合体構造を予測することで検討を試みた。

実験研究から、CYP1A2.13 は、CYP1A2.1 に比較し 70 %の酵素活性を保持していることが分かっている [36]。CYP1A2.1 と CYP1A2.13 と RMSF を比較したところ、大きな違いは見られなかった (Figure III-3-8E)。さらに、CYP1A2.13 の三次構造は CYP1A2.1 と良く似ており、ヘムや基質認識にとって重要な部分構造が良く重なることがわかった (Figure III-3-10)。これらのことから、CYP1A2.13 において酵素機能が維持された原因は、その三次構造や構造柔軟性が CYP1A2.1 に類似していることにあるのではないかと考えられた。CYP1A2.13 の変異である Gly299Ser は、HI ループの中間に位置し、溶媒露出面に存在する。このことから、Gly299Ser が酵素活性に大きな影響を与えなかった原因は、変異の場所がタンパク質のコアから離れていて、三次構造に影響しなかったためではないかと考えられた。

CYP1A2.14 の RMSF については、KL ループの Gly486 が 0.51 Å だけ高かったことを除けば、CYP1A2.1 と良く似た結果が得られた (Figure III-3-8F)。CYP1A2.13 と同様に、CYP1A2.14 も三次構造や構造柔軟性において CYP1A2.1 に比べ大きな違いは見られなかった。CYP1A2.14 の変異である Thr438Ile も溶媒露出面に存在している (Figure III-3-3F and III-3-4B)。CYP1A2.14 は酵素活性の上昇が報告されている変異体である。本節における研究結果からは、CYP1A2.14 の活性が上昇した原因について予測することはできなかったが、RMSF や構造柔軟性の予測から Thr438Ile が構造柔軟性や三次構造に大きく影響しないために、CYP1A2.14 の酵素活性が保持されているということが示唆された。本節における研究では、MD シミュレーションのみを用いて遺伝子変異体における酵素活性の変化を予測しようとしたが、活性上昇の原因としては反応メカニズムが関与している可能性が高い。CYP1A2.14 における活性上昇の原因を探るためには、CYP1A2 の電子状態を考慮した、量子力学計算をとりいれて検討を行う必要がある。量子力学計算を用いて CYP の触媒サイクルを詳細に理解することを、今後の課題として考えている。

CYP1A2.15 は酵素活性の低下が報告されている変異体である [36]。CYP1A2.15 の変異である Pro42Arg は、その三次構造において N 末端膜結合ドメインに続くループに位置している (Figure III-3-3G)。真核生物の CYP は膜結合型であり、その N 末端側のプロリンが豊富に存在する領域は良く保存された領域の一つである [72]。このプロリンリッチドメインは CYP タンパク質のフォールディングに関与していると考えられている [73]。MD シミュレーションにより予測された CYP1A2.1 において、Pro42 は周辺残基と相互作用せずに、N 末端ドメインはフリーな状態であった。しかし、CYP1A2.15 では、Arg42 が Val75 と Tyr400 の間で水素結合を形成し、N 末端ドメインとタンパク質コアの間に相互作用が存在することが示唆された (Figure III-3-11)。CYP1A2.15 の RMSF

については、Ser213 において 0.71 Å、Ser233 において 0.76 Å、CYP1A2.1 よりも RMSF が高かった (Figure III-3-8G)。Pro42Arg はタンパク質コアからは十分な距離があるのだが、このような構造柔軟性における差異も、Pro42Arg が引き起こしたものであると考えられる。これらの結果から、CYP1A2.15 において酵素活性が低下した原因は、Pro42Arg がタンパク質コアと相互作用することで、そのフォールディングを変えてしまったためであると考えられる。

CYP1A2.16 は活性が検出限界以下まで低下した変異体である。本節において予測された変異体タンパク質のうち、CYP1A2.16 は三次構造においても構造柔軟性においても最も顕著な特徴を示した。まず三次構造について CYP1A2.1 と比較すると、ヘムのポルフィリン環平面のすぐ傍に存在する KL ループが CYP1A2.16 においては部分的に β シートを形成していることがわかった (Figure III-3-12)。KL ループにおける構造的差異がヘムの位置や向きを変えてしまうことで、その触媒機能に低下させた可能性が考えられる。それに加え、CYP1A2.16 の RMSF は、CD ループの Ala154 において CYP1A2.1 に比べて 4.8 Å 高かった。CYP1A2.16 の変異である Arg377Glu は、K ループの C 末端側に存在し (Figure III-3-3H and III-3-4H)、Ala154 からは遠く離れている。C ヘリックスはヘムと相互作用のある領域である。そのため、その C ヘリックスに続く CD ループの構造柔軟性の差異は、ヘムの安定性に影響する可能性あると考えられる。これらの結果は、Arg377Glu が三次構造と構造柔軟性の両方を変化させたことで、ヘムの安定性を低下させた可能性があることを示唆している。

本研究において検討した 8 種類の変異体のうち、Ile386Leu、Arg456His、Arg377Glu はタンパク質のコア、ヘムの周辺に存在する変異である。この 3 種類の変異体は全て活性が検出限界以下まで低下している。なかでも CYP1A2.16 (Arg377Glu) は三次構造と構造柔軟性の両方において、CYP1A2.1 に比べ大きな違いを持つことが示唆された。また、CYP1A2.8 (Arg456His) は準安定構造が存在する可能性が示唆された。Arg377 や Arg456 は空間的にヘムの近くに存在するものの、ヘムとの直接的な相互作用はない。しかし、Arg456His や Arg377Glu の変異は側鎖の静電的性質が大きく変化するため、ヘム周辺の静電ポテンシャルに大きな影響を与える可能性がある。これらのことから、CYP1A2.8 や CYP1A2.16 の酵素活性が大きく低下した原因は、Arg456His と Arg377Glu の変異がタンパク質の中心部において静電的環境を大きく変えたことにあると予想された。また、ヘム周辺の静電相互作用の変化はヘムの電子状態に影響し、その触媒サイクルを乱した可能性も考えられる。それに対して、CYP1A2.4 の変異である Ile386Phe は側鎖の静電的性質はほとんど変化がない。しかし、Phe386 側鎖の空間的高さは Ile386 に比べ大きく、三次構造と構造柔軟性を大きく変化させる可能性がある。このことが CYP1A2.4 の活性が大きく低下した主たる原因であると考えられる。加えて、Phe386 の π 電子による相互作用がヘムの環境を乱した可能性も考えられる。

遺伝子変異型 CYP1A2 において、シトクロム P450 レドックスパートナーの結合部位

周辺における塩基性残基の変異は、CYP1A2.6 (Arg431Trp)、CYP1A2 (Arg456His)、CYP1A2.16 (Arg377Glu) で存在する。これらの変異体の酵素活性は、CYP1A2.1 に比べて 10 % 以下まで低下していることが報告されている [36]。このことから、これらの変異体において活性が低下した原因の一つには電子伝達において重要な機能を持つ Arg が存在しないからではないか、ということが可能性として考えられた。一方で、KL ループにおいて変異を持つ遺伝子変異型 CYP1A2 には、CYP1A2.14 (Thr438Ile) があるが、この変異体では活性が大幅に上昇していることが報告されている [36]。しかし、Thr438Ile については、Arg456His や Arg377Glu とは異なり、電荷の変化は無視できるほど小さいのでレドックスパートナーとの相互作用表面にほとんど影響しないと予想される。本節において予測された CYP1A2.14 モデルは、シトクロム P450 レドックスパートナーとの予想された結合領域において、三次構造についても構造柔軟性においても CYP1A2.1 と比べて大きな違いが見られなかった。そのため、CYP1A2.14 で活性が上昇した原因としては、タンパク質の構造や性質にあるのではなく、ヘムの触媒機能自体にあるのではないかと考えられた。ヘムの電子状態を明らかにし、その触媒サイクルを理解することは、古典力学を用いた MD シミュレーションでは検討することができない。CYP1A2.14 のように遺伝子変異により活性が上昇した原因について探るため、本研究に量子化学計算を取り入れて、QM/MM (Quantum Mechanics / Molecular Mechanics method) 法を利用することを計画している。本研究の結果からは、少なくとも CYP1A2.14 は CYP1A2.1 と同等の触媒機能を有している、ということを示唆することができた。

III-3-4. 結論

本節における研究では、遺伝子変異型 CYP1A2 の三次構造と構造柔軟性を、MD シミュレーションを用いて予測した。その結果から、一つのアミノ酸残基の変異がその周辺の立体構造だけでなく、離れた部位の立体構造にも影響を及ぼすことが示唆された。さらに、そのアミノ酸残基の変異は、構造柔軟性を変化させることが示唆された。CYP は基質の結合により大きな構造変化を引き起こすため、構造柔軟性は基質の結合に対応して複合体を形成するための重要な性質である。遺伝子変異が、立体構造や構造柔軟性を変化させるという結果は、CYP2B6 を対象とした小林らによる計算研究においても得られているが、本節における研究ではより長時間の MD シミュレーションを行ったことで先行研究よりも大きな構造的差異や動的性質における違いを見ることができた。本節における結果から、遺伝子変異型 CYP1A2 の酵素活性低下の原因について理解するためには、その立体構造だけでなく構造柔軟性についても検討する必要があることが示唆された。このことは、CYP に限らず、基質との結合により構造変化が必要となるそれ以外のタンパク質についても同じことが言えると考えられる。本節の研究で用いた手法は、CYP を含む多くの機能性タンパク質の構造と機能を予測する際に有用であると考えられる。

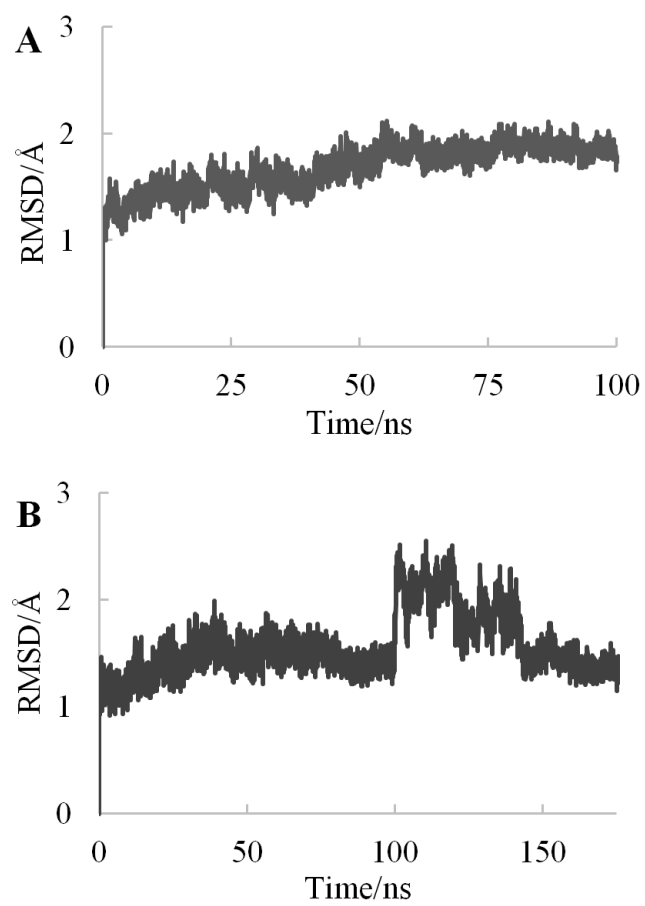


Figure III-3-1. Root mean square deviations of (A) CYP1A2.1 and (B) CYP1A2.8

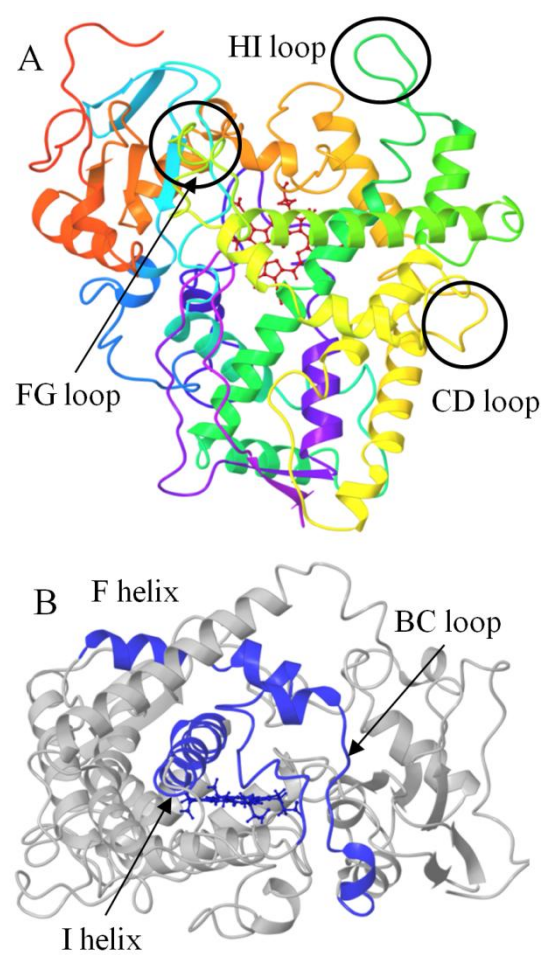


Figure III-3-2. Optimized structure of wild-type CYP1A2. (A) CD, FG and HI loops are circled. (B) BC loop, F and I helices are shown in blue and the other region is shown in gray.

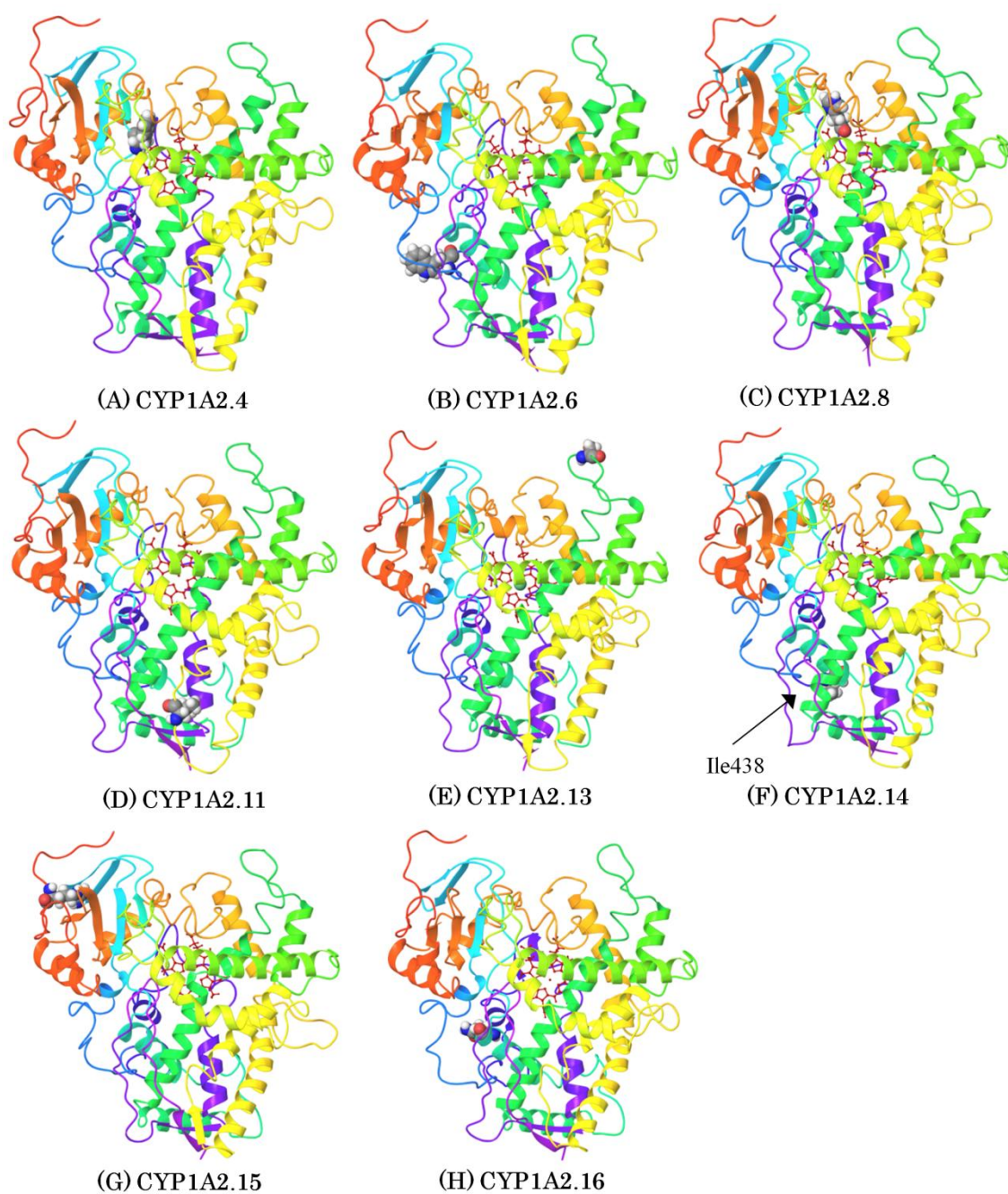


Figure III-3-3. Overall structures of (A) CYP1A2.4, (B) CYP1A2.6, (C) CYP1A2.8, (D) CYP1A2.11, (E) CYP1A2.13, (F) CYP1A2.14, (G) CYP1A2.15, and (H) CYP1A2.16. The mutation positions are presented as spheres.

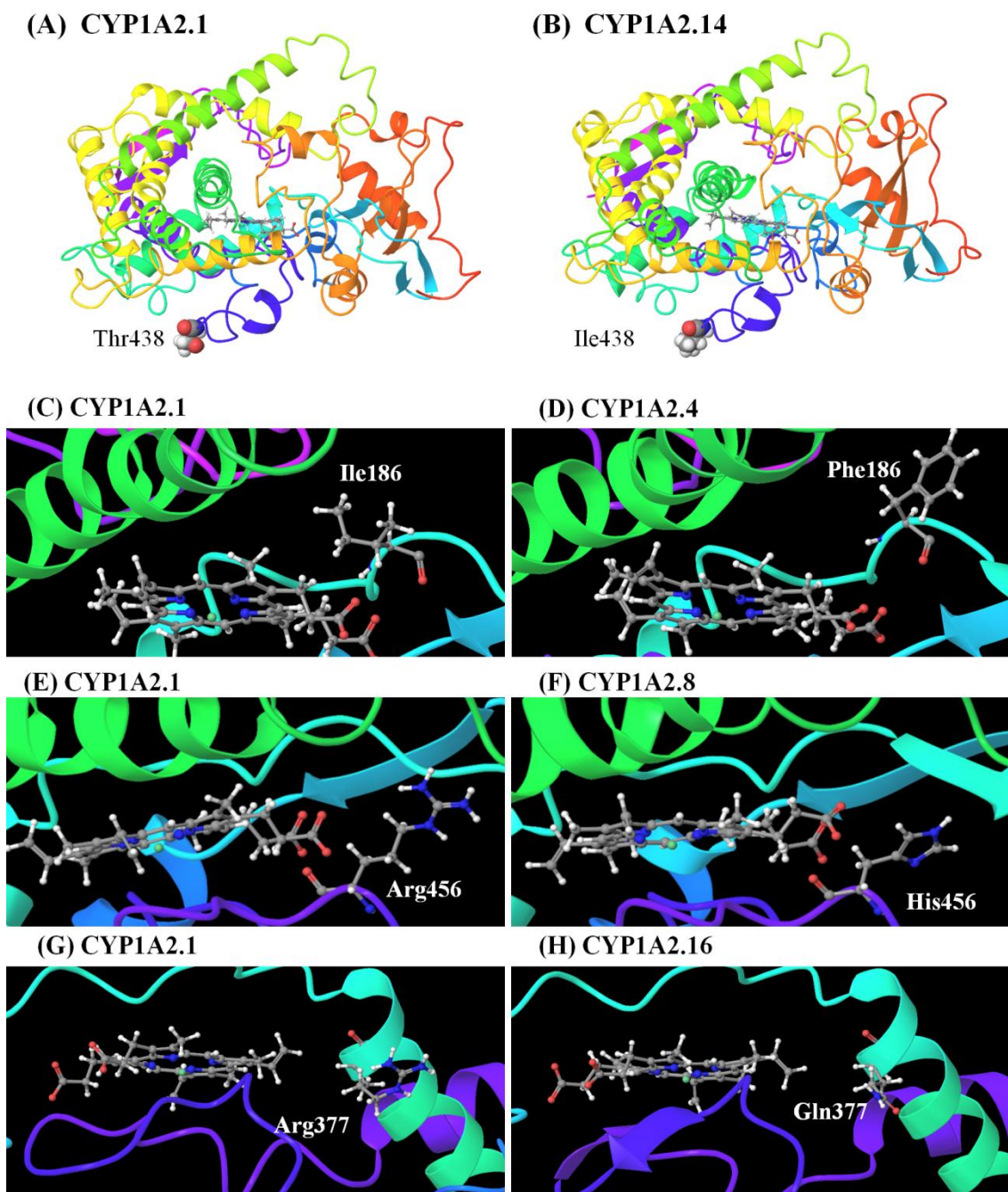


Figure III-3-4. Position of the substituted residues for wild-type and mutant CYP1A2. (A)(C)(E)(G) CYP1A2.1, (B) CYP1A2.14, (D) CYP1A2.4, (F) CYP1A2.8, (H) CYP1A2.16. The mutation positions are presented as spheres (A)(B) and ball-and-stick model (C)(D)(E)(F)(G)(H).

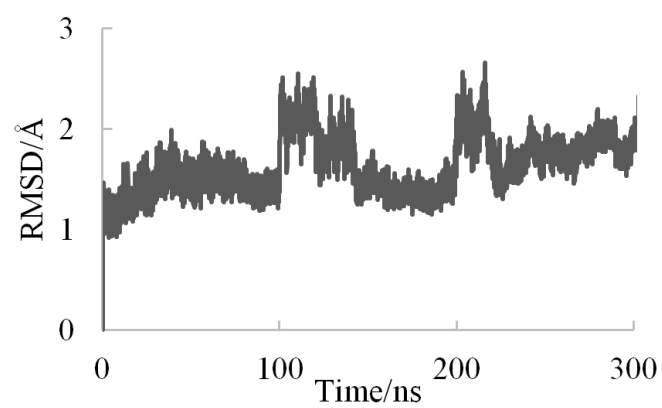


Figure III-3-5. Root mean square deviations of CYP1A2.8 calculated using 300 ns MD simulation.

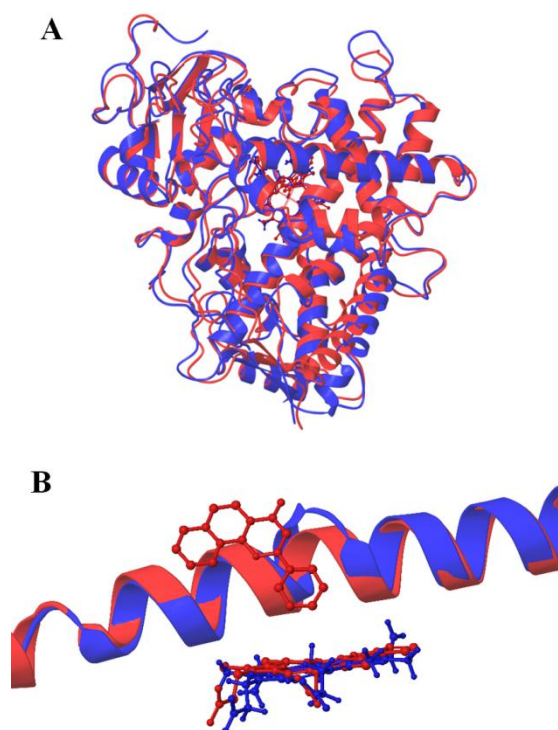


Figure III-3-6. Superimposition of the 2HI4 crystal structure and the predicted ligand-free CYP1A2.1 structure. (A) Overall structures and (B) partial structure of the hemes and I helices.

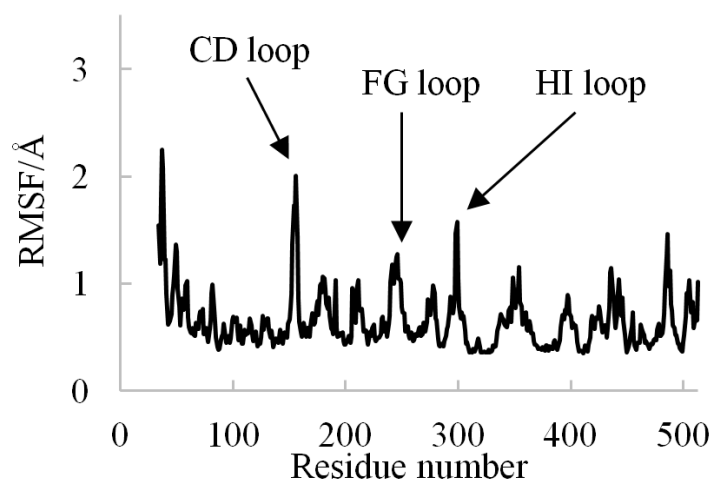


Figure III-3-7. Root mean square fluctuations of the α carbon atom of wild-type CYP1A2. The flexibility of amino acid residues was high in the CD loop, FG loop, and HI loop. They are indicated by arrows.

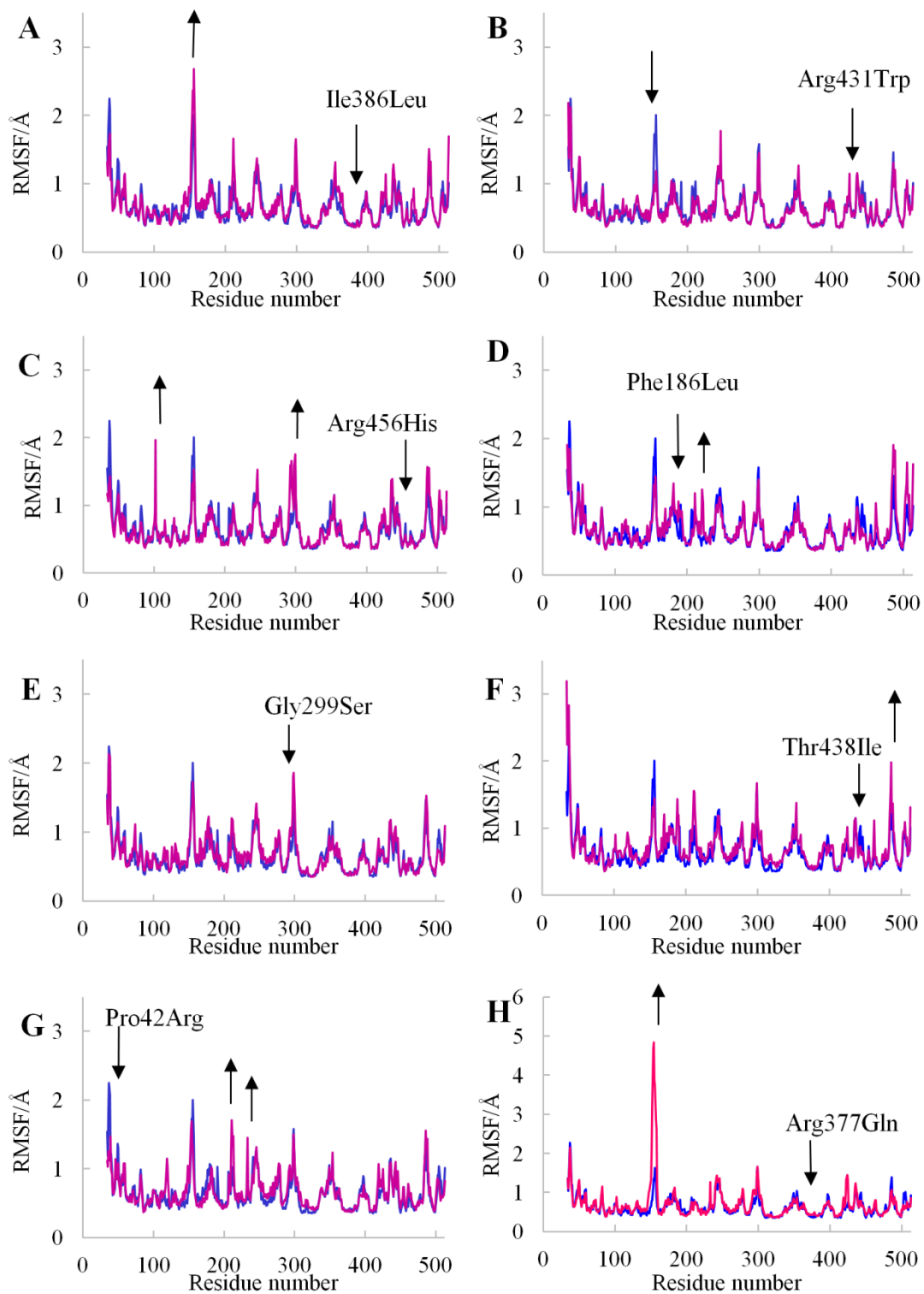


Figure III-3-8. Superposition of root mean square fluctuations of the α carbon atom of wild-type CYP1A2 (gray) and mutant CYP1A2 (magenta). Amino acid residues which have higher flexibilities over 0.6 \AA than that of wild-type are pointed by arrows. The mutation positions are also pointed by arrows.

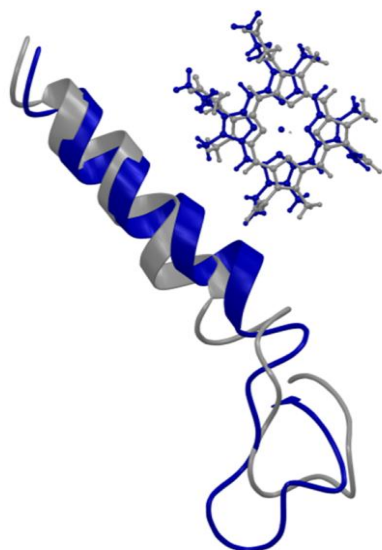


Figure III-3-9. Relative position of the hemes and peptide main chains, including the C helix for CYP1A2.1 (gray) and CYP1A2.4 (blue).



Figure III-3-10. Overall structures of CYP1A2.1 (gray) and CYP1A2.13 (blue).

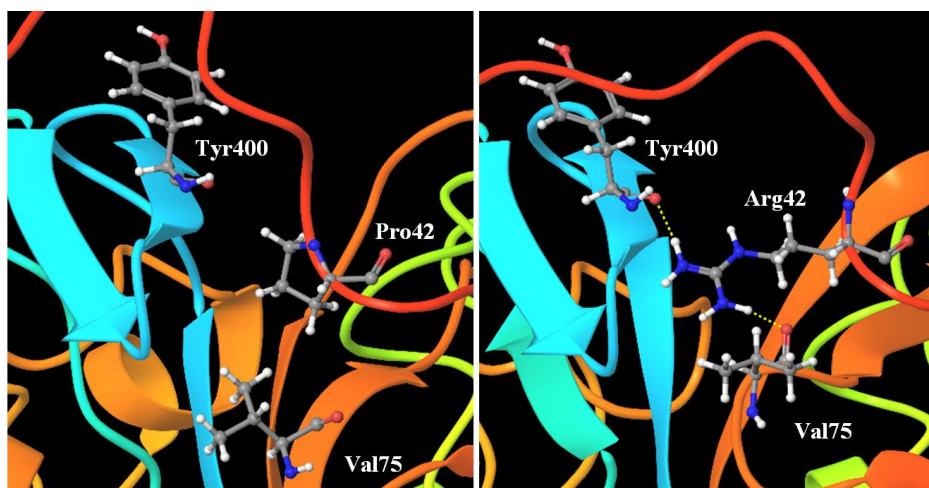


Figure III-3-11. Hydrogen bonds between the 42th residue and Val75 and Tyr400 in the 3D structure of CYP1A2.1 (left) and CYP1A2.15 (right)

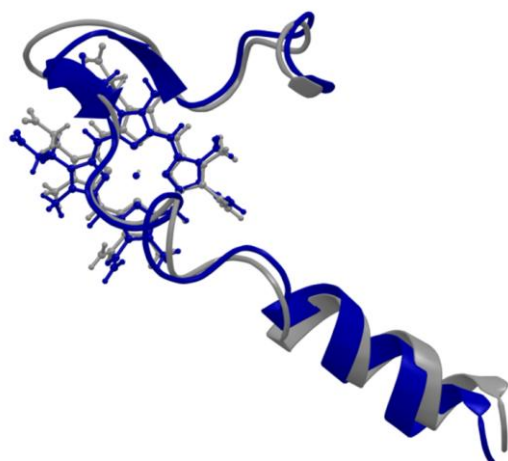


Figure III-3-12. Relative position of the hemes, KL loops, and L helices for CYP1A2.1 (gray) and CYP1A2.16 (blue).

III-4. ドッキングと MD シミュレーションを用いたシトクロム P450 1A2 の水分子が仲介する基質認識についての研究

III-4-1. 序

CYP1A2 の結晶構造 (PDB ID: 2HI4) において、活性部位に水分子が存在することが報告されている (Figure III-4-1A) [37]。この水分子はリガンドである ANF のカルボニル基酸素と Gly316 のカルボニル基酸素の間に存在して、水素結合を形成しているとされる (Figure III-4-1B)。CYP1A2 の結晶構造だけでなく、それと相同性の高い CYP1A1 (PDB ID: 4I8V) や CYP1B1 (PDB ID: 3PM0) においても ANF との複合体構造が得られている。これらの結晶構造においても水分子は ANF のすぐ存在するのが、水素結合ネットワークは形成されていなかった。水分子は小さく可動性が高いため、実験的にその機能を調べることは難しく、CYP1A2 の結晶構造における水分子の役割は十分に理解されていなかった。

量子力学計算により、活性部位に存在する水分子の機能やエネルギー状態、ヘムとの相互作用が調べられているが [111-113]、その詳細について明らかにされていない。そこで、本節における研究では、ドッキングと MD シミュレーションにより CYP1A2 とその基質である 7-エトキシレゾルフィン (7ER) (Figure III-4-2A) との複合体構造を予測し、活性部位に存在する水分子の役割について調べた。さらに、基質との複合体構造に比較して、阻害剤である ANF (Figure. III-4-2B) との複合体構造も作成し、基質と阻害剤におけるリガンド認識の違いについても検討を行った。

CYP は薬物動態において最も重要な酵素の一つであり、その反応メカニズムについての理解は、医薬品開発において有用であると期待される。さらに、本研究における水分子が介したリガンド認識に関する知見は、CYP に限らず、多くのタンパク質を対象とした Structure-Based Drug Design (SBDD) に役立つことができると期待される。

III-4-2. 方法

基質非結合型の CYP1A2 の三次構造は、第 III-3 節において予測した構造を用いた。7ER との複合体構造はドッキングと 200 ns の MD シミュレーションにより作成した。まず、ドッキングの対象として、第 III-3 節における基質非結合型の CYP1A2 の 100 ns の MD トラジェクトリから、5 ns 毎に 21 個の構造を抽出した。この複数の構造を抽出する操作は熱による構造の揺らぎを考慮するために行っている。これらの構造に対し、疎水性空間を HBOP/HBSITE [114,115] により探し出し、リガンド結合部位とした。この疎水性空間に対してドッキングを行い、それぞれの構造に対し 10 個ずつポーズを得た。得られたドッキングポーズのうち、7ER の酸化部位であるエトキシ基がヘムに向いており、かつドッキングスコアが最も高いものを 7ER との複合体 (CYP1A2-7ER) の初期構造とした。一方で、ANF との複合体の初期構造は、タンパク質と ANF の構造を

結晶構造から抽出して利用した。ただし、活性部位で観測された水分子の役割について調べるため、ANF との複合体初期構造は二種類作成した。一つは結晶構造から結晶水を全て除いたもの (CYP1A2-ANF) であり、もう一つは活性部位に存在する水分子だけを残したもの (CYP1A2-ANF-WAT) である。これら三種類の複合体は、その平衡構造を得るため少なくとも 200 ns 以上の MD シミュレーションを行った。ドッキングプログラムには GOLD 5.2.2 [116] を用い、それ以外の計算条件は第 III-3 節における研究と同じ条件下行った。

MD シミュレーションにより予測された CYP1A2 の三次構造を評価するため、ペプチド主鎖の RMSD とリガンドの RMSD を算出した。RMSD の参照構造としては、昇温 MD シミュレーション後の構造を用いた。また、残基の構造柔軟性を評価するため、C α 原子の RMSF を算出した。RMSF 計算の参照構造には 180-200 ns の平均構造を利用した。RMSD と RMSF の計算には、AmberTools12 の cpptraj モジュールを用いた。また、ヘムと Arg456 の間の相互作用を評価するために、ヘムのプロピオン酸酸素から、Arg456 のグアニジノ基の最も近い窒素までの距離を測定した。活性部位における水分子の役割について調べるため、180-200 ns の MD トラジェクトリから 200 ps 毎に 100 個の構造を抽出して、活性部位における水素結合ネットワークを調べた。CYP1A2-7ER、CYP1A2-ANF については 200 ns の MD シミュレーションを行ったが、CYP1A2-ANF-WAT のみは、500 ns の MD シミュレーションを行った。条件を統一させるため、RMSF と水素結合頻度の計算には 200 ns までの MD トラジェクトリを用いている。同じ理由で、CYP1A2-7ER、CYP1A2-ANF、CYP1A2-ANF-WAT 全ての最適化構造は、200 ns の MD シミュレーション後に最適化したものを示した。

III-4-3. 結果と考察

CYP1A2-7ER については、200 ns の MD シミュレーションを行った。そのタンパク質とリガンドの RMSD はほぼ収束しており (Figure III-4-3A and III-4-3B)、CYP1A2-7ER の平衡構造が得ることができたと考えられた。また、200 ns の MD シミュレーション後の最適化構造において、7ER の周囲には基質認識に関与すると考えられている BC ループ、F ヘリックス、I ヘリックスが存在した。基質である 7ER はエトキシ基の 1 位炭素が酸化部位となる。活性部位内の 7ER は、エトキシ基がヘム鉄に近いポーズをとっていた (Figure III-4-4A)。さらに、100-200 ns の MD トラジェクトリで、7ER の 1 位炭素からヘム鉄までの距離を測ったところ、4~6 Å の一定の距離を保っていることがわかった (Figure III-4-5)。これらの結果から、CYP1A2-7ER については酵素反応に矛盾しない構造を得ることができたと考えられた。

CYP1A2-7ER 最適化構造の活性部位には、複数の水分子が存在することがわかった (Figure. III-4-6)。水はヘムの第六配位子としてその触媒反応に関与していると考えられており [86]、水が CYP の活性部位に到達できるかどうかは重要な問題である。本節

における研究で、CYP1A2-7ER の初期構造に対して TIP3P モデルを溶媒として置いた時点では、活性部位に水分子は存在していなかった。しかし、200 ns の MD シミュレーションを行い、構造最適化をしたところ、その活性部位には三つの水分子が存在した。そのうちの一つは I ヘリックスの Asp320 と C 末端ループの Thr498 との間に水素結合を形成し、これらの残基と 7ER の窒素との水素結合を仲介していた。さらに、残りの二つについても BC ループの Thr124 と 7ER の間に位置して、水素結合を形成していた。これらの水素結合ネットワークが MD シミュレーションの間にも形成されているのかどうか調べるため、180-200 ns のトラジェクトリから 200 ps 毎に 100 個の構造を抽出し、リガンド周辺の水素結合ネットワークを調べた。その結果、Asp320-WAT-7ER と Thr498-WAT-7ER において形成される水素結合は、それぞれ 52 % と 45 % で確認された。さらに、Asp320-WAT-7ER と Thr498-WAT-7ER の水素結合が同時に形成される確率は、41 % であることがわかった。CYP1A2-7ER の活性部位における水素結合ネットワークのダイアグラムを Figure III-4-7 に示す。

CYP1A2-7ER の MD シミュレーションの最後 180-200 ns の間、活性部位には複数の水分子が存在しているのだが、Asp320-WAT-7ER と Thr498-WAT-7ER の間で水素結合を形成しているのは、一つの水分子であることがわかった。このことは、基質と残基との間で水素結合を仲介する水分子が、20 ns の間、活性部位の同じ位置に留まっていることを表している。その理由として、Asp320-WAT と Thr498-WAT の間の水素結合は、それぞれ 95 % と 86 % の頻度で形成されていた。この結果から、Asp320 と Thr498 による強い相互作用が特定の水分子を同じ場所に留めていると予想された。これらの結果は、CYP1A2 の基質認識には、水分子が働いている可能性を示唆している。さらに、その基質認識には Asp320 と Thr498 が関与している可能性が示唆された。CYP1A2 と 7ER との複合体構造は、先行研究においても予想されているのだが、活性部位における水分子の関与については議論されていなかった [98,99,104]。

CYP1A2-7ER の最適化構造において、Thr124 は二つの水分子を介して 7ER と水素結合を形成していた。しかし、180-200 ns のトラジェクトリにおいては、水素結合の形成は見られなかった。その原因としては、これらの水分子が活性部位内で動き回るためであると考えられる。Thr124 は Asp320 や Thr498 に比べて 7ER から距離があるため、7ER との相互作用が難しいと考えられる。本節において予測された結果からは Thr124 が基質認識に関与しているかどうか判断できないが、7ER よりも大きな基質が活性部位に結合した場合には、Thr124 も基質認識に関与する可能性がある。

CYP1A2-ANF についても、200 ns の MD シミュレーションを行うことでタンパク質主鎖とリガンドの RMSD が収束しており (Figure III-4-2C and III-4-2D)、CYP1A2-ANF の平衡構造を得ることができたと考えられた。このことは、ANF が CYP1A2 の活性部位に安定な状態で結合できることを示唆しており、ANF が競合阻害剤であるという事実には矛盾しない。けれども、150 ns の MD シミュレーション以降、そのタンパク質の

RMSD は 2.5 Å を超えており、結晶構造からは大きく構造が変化していることが考えられた。このことから、結晶構造に何らかのひずみが存在しており、平衡構造からずれている可能性が示唆された。一般に、タンパク質の結晶化は、結晶化を容易にするために生体内環境からかけ離れた実験条件下で行われている。CYP1A2 と ANF の結晶構造についても、実験条件によるひずみが存在する可能性が考えられた。また、基質と阻害剤の違いについて検討するため、CYP1A2-ANF と CYP1A2-7ER のリガンドの RMSD を比較した。その結果、7ER は 3 Å 以上で推移していたのに対し、ANF は 1 Å 以下とかなり小さいことがわかった (Figure III-4-2B and III-4-2D)。このことから、活性部位における ANF の挙動の 7ER とは異なっていることが示唆された。このことは、ANF のリガンド周辺残基との相互作用が、7ER とは異なっている可能性が示唆している。

200 ns の MD シミュレーション後の CYP1A2-ANF 最適化構造において、活性部位には水分子が存在しなかった (Figure III-4-6B)。180-200 ns の MD トラジェクトリにおいて ANF 周辺の水素結合を調べたところ、水分子は活性部位の中に入り込んでいたが、ANF と残基間の水素結合を仲介していないことがわかった。CYP1A2-ANF では、CYP1A2-7ER のように水分子が介した水素結合は存在しなかったが、その代わりに、F ヘリックスの Thr223 が ANF と水素結合を形成していた (Figure III-4-7B)。この水素結合は Thr223 のヒドロキシ基水素と、ANF のカルボニル基酸素の間に形成され、180-200 ns の MD トラジェクトリの間、41 % の頻度で見られた (Figure III-4-8B)。Thr223 は、活性部位に覆いかぶさるように存在する F ヘリックスの残基の一つである。この Thr223 との相互作用については、CYP1A2-7ER では確認されなかった。このことから、CYP1A2-ANF では基質認識に水分子を必要とせず、Thr223 が ANF の基質認識において機能すると考えられた。また、ANF の場合は、水分子を介することなく周辺残基と相互作用するため、比較的揺らぎが少ない状態で活性部位内に存在すると考えられた。このことが、ANF の RMSD が 7ER の RMSD よりも数値が小さかった原因であると考えられた。

CYP1A2-ANF-WAT は、200 ns の MD シミュレーションでは、タンパク質とリガンドの RMSD が共に収束しなかったため、500 ns の MD シミュレーションを行った (Figure III-4-3E and III-4-3F)。CYP1A2-ANF と CYP1A2-ANF-WAT は同じ ANF との複合体であるのに、RMSD の特徴が大きく異なっている。特に、ANF の RMSD に着目すると、CYP1A2-ANF では 2 Å 以下という低い数値で推移しているのに、CYP1A2-ANF-WAT では、1~4 Å で大きく変動を繰り返していた。このことから、CYP1A2-ANF-WAT は 500 ns の MD シミュレーションでは平衡構造が得られていない可能性が示唆された。

200 ns の MD シミュレーション後の CYP1A2-ANF-WAT の最適化構造において、活性部位に水分子が存在することがわかった。その水分子は、ANF のカルボニル酸素と Asp320 と Thr498 の間に水素結合を形成しており、CYP1A2-7ER の活性部位における水素結合ネットワークに類似していた。180-200 ns の MD トラジェクトリにおいて、それ

らの水素結合頻度を調べたところ、Asp320-WAT-ANF の水素結合は 31 %、Thr498-WAT-ANF の水素結合は 20 %と CYP1A2-7ER に比べて、20 %ほど低いことがわかった。さらに、Asp320-WAT-ANF と Thr498-WAT-ANF の水素結合が同時に形成される頻度を調べたところ、わずか 7 %であった。これは、CYP1A2-7ER における 41 %に比べ 30 %以上低い。CYP1A2-ANF-WAT が CYP1A2-7ER に比べ、水素結合頻度が低かった理由としては、CYP1A2-ANF-WAT の水素結合ネットワークでは、水分子の入れ替わりが起きていることが挙げられる。CYP1A2-7ER においては、1 個の水分子がリガンドと残基間の水素結合を仲介していたのが、CYP1A2-ANF-WAT では、6 個の水分子が入れ替わり水素結合を形成していた。これらの結果から、CYP1A2-ANF-WAT ではリガンド周辺の水素結合ネットワークが切れやすく、ANF が活性部位内で不安定な状態であるということが考えられた。

基質の結合による、CYP1A2 の構造柔軟性について比較するため、基質非結合型の CYP1A2 と CYP1A2-7ER の RMSF を比較した (Figure III-4-8A)。CD ループの構造柔軟性において最も大きな違いが見られ、基質非結合型 CYP1A2 では 1.56 Å であったが、CYP1A2-7ER では 2.00 Å であった。CD ループはヘムと相互作用のある C ヘリックスに続くループである。そのため、CD ループにおける構造的差異は、C ヘリックスにおけるヘムとの相互作用に関係していると予想される。ヘムと相互作用のある C ヘリックス付近の領域で動的性質が大きく変化したことは、ヘムの状態に合わせて CYP タンパク質が構造変化を起こしている可能性を示唆している。加えて、C ヘリックスはシトクロム P450 レドックスパートナーとの相互作用部位であると考えられている。CD ループにおける構造柔軟性の差異はそのレドックスパートナーとの相互作用に関係している可能性がある。したがって、CD ループにおける構造柔軟性の低下は、基質の結合によりそのレドックスパートナーとの相互作用に有利な構造変化を起こしていることが可能性が考えられた。

CYP1A2-ANF の RMSF は CYP1A2-7ER の RMSF と良く似ていることがわかった (Figure III-4-5B)。この結果は、CYP1A2-ANF と CYP1A2-7ER は、良く似た動的性質を持つことが示唆している。このことから、ANF は CYP1A2 に対して阻害剤として働くが、構造変化には影響を及ぼさない可能性が高いことが考えられた。それに対し、CYP1A2-ANF-WAT の構造柔軟性については、CYP1A2-7ER の結果と比較して、CD ループにおける RMSF が 0.81 Å 高かった (Figure III-4-5C)。加えて、CYP1A2-ANF の RMSF と比較しても、CD ループにおいて 0.8 Å の差があった。これらの結果から、CYP1A2-ANF-WAT の活性部位に存在した水分子は、リガンド周辺の水素結合ネットワークを変化させることで、複合体の動的性質にも影響することが示唆された。

CYP のヘム結合ドメインは最も保存された領域であり、ヘムの第六配位子である Cys 周辺のアミノ酸配列 (FXXGERXCXG) は全ての CYP において広く保存されている [73-75]。特に、Cys から一残基離れた Arg はヘムのプロピオン酸と静電的相互作用する

ことでヘムの配置に関与していると考えられている [74]。CYP1A2 の結晶構造においても Cys458 のそばに Arg456 が位置し、ヘムのプロピオン酸の酸素原子と相互作用しうる距離にある (Figure III-4-9)。本節における複合体モデルにおいて、Arg456 とヘムの相互作用を検討するため、Arg456 のグアニジノ基窒素からヘムのプロピオン酸酸素までの距離を調べた (Figure III-4-10)。まず、CYP1A2-7ER においては、200 ns の MD シミュレーション全体で、2.85 Å という一定の距離を保っていることがわかった (Figure III-4-10A)。この結果から、CYP1A2-7ER においては Arg456 とヘムの間に十分な相互作用が存在するということが示唆された。それに対し、CYP1A2-ANF では、200 ns の MD シミュレーションの間で Arg456 からヘムまでの距離が 2.55 Å から 5.89 Å まで離れることがわかった (Figure III-4-10B)。特に 150 ns 以降は、距離が 5 Å を超えており、ヘムと Arg456 の間の相互作用が弱くなっていることが示唆された。また、CYP1A2-ANF-WAT においても、Arg456 からヘムまでの距離は、かなり離れていることがわかった (Figure III-4-10C)。CYP1A2-ANF-WAT では、200 ns から 400 ns、400 ns から 550 ns の間に段階的に距離が変化しており、最終的に 470 ns 以降は 2.87 Å から 5.29 Å で推移している。これらの結果から、ANF をリガンドとして結合させた時には、いずれもヘムから Arg456 までの距離が遠く、基質である 7ER との複合体に比べて相互作用が弱くなっていることがわかった。CYP1A2-7ER における Arg456 とヘムプロピオン酸の相互作用を予測した結果から、Arg456 はヘムを CYP タンパク質に固定する役割を持つと考えられた。対して、CYP1A2-ANF や CYP1A2-ANF-WAT は、Arg456 とヘムプロピオン酸との相互作用が弱く、酵素反応に適した複合体構造が形成されていない可能性が示唆された。適切な複合体構造が形成できないことが、ANF が阻害剤として働く理由である可能性が考えられた。

ANF との複合体モデルにおいて Arg456 とヘムの相互作用が弱まっている原因を探するため、Arg456 と相互作用している残基を調べた。それぞれの複合体の 200 ns の MD シミュレーション後の最適化構造において Arg456 と相互作用をしている残基を確認したところ (Figure III-4-11)、CYP1A2-7ER においては、Arg456 はヘムのプロピオン酸酸素以外に、Lys106 や Asp128 とも相互作用をしていることがわかった (Figure III-4-11A)。それに対し、CYP1A2-ANF では、Arg456 は Lys106 と Asp128 に加え、Ser126 との間の相互作用が存在することがわかった (Figure III-4-11B)。また、CYP1A2-ANF-WAT では 200 ns の MD シミュレーションでは平衡構造に至っていないが、その最適化構造では、Arg456 はヘムに加えて、Lys106 と近い距離にあることがわかった (Figure. III-4-11C)。Lys106、Ser126、Asp128 はいずれも BC ループに存在する残基である。これらの相互作用が MD シミュレーションにおいても保たれているのか調べるため、Arg456 の側鎖窒素原子(NH2)から Lys106、Ser126、Asp128 の酸素原子までの距離を調べた (Figure III-4-12, III-4-13, and III-4-14)。まず、Lys106 との距離は、CYP1A2-7ER において MD シミュレーション全体でほぼ一定の距離を保っていることがわかった (Figure III-4-12A)。平均

すると 2.92 Å であり、十分な相互作用が存在すると考えられた。CYP1A2-ANF においても、平衡構造が得られた 170 ns 以降は平均 2.85 Å の距離を保っていた (Figure III-4-12B)。一方で、CYP1A2-ANF-WAT では、500 ns の MD シミュレーションを行っても Arg456 から Lys106 までの距離が一定ではないことがわかった (Figure III-4-12C)。次に、Ser126 と Arg456 との距離は、CYP1A2-7ER では、MD シミュレーションを通して一定であり、5.05 Å の距離を保っていた (Figure III-4-13A)。そのため CYP1A2-7ER においては、Arg456 と Ser126 の間の相互作用は弱いと考えられた。それに対し、CYP1A2-ANF では、CYP1A2-7ER よりも距離が近く、170 ns 以降は、平均 2.85 Å の距離を保っていることがわかった (Figure III-4-13B)。CYP1A2-ANF-WAT においては、Ser126 から Arg456 までの距離は 2.6~6.0 Å で大きく変動していることがわかった (Figure III-4-13C)。最後に、Asp128 から Arg456 までの距離については、CYP1A2-7ER では、平衡構造が得られた 170 ns 以降は平均 3.14 Å の距離を保っており、相互作用が存在しうると考えられた (Figure III-4-14A)。CYP1A2-ANF においても、170 ns 以降の平均距離は 2.82 Å であり、Asp128 と Arg456 の間に十分な相互作用が存在すると考えられた (Figure III-4-14B)。一方で、CYP1A2-ANF-WAT では、200 ns から 500 ns で Asp128 から Arg456 までの距離が 2.5~6.7 Å の範囲で変動しており、500 ns の MD シミュレーションを終えたあとも距離が定まらないことがわかった (Figure III-4-14C)。以上から、Arg456 と Lys106、Ser126、Asp128 との相互作用についてまとめると、CYP1A2-7ER では Arg456 と Lys106、Asp128 との間には十分な相互作用があると予想された。このことから、CYP1A2-7ER には Lys106 と Asp128 との相互作用により Arg456 の側鎖が固定されるため、Arg456 とヘムの間に十分な相互作用が存在したと考えられた。それに対し、CYP1A2-7ER において、Arg456 と Ser126 との間に相互作用は見られなかったが、CYP1A2-ANF では Arg456 と Ser126 の間に相互作用が存在した。CYP1A2-ANF では、CYP1A2-7ER と同様に Asp456 と Lys106 や Asp128 との間に相互作用が存在したものの、ヘムからは少し離れた Ser126 と相互作用しているために、Arg456 がヘムから遠くなってしまったと考えられる。一方で、CYP1A2-ANF-WAT では、Arg456 から Lys106、Ser126、Asp128 までの距離は一定ではなく、相互作用が弱い可能性が示唆された。したがって、CYP1A2-ANF-WAT においてヘムと Arg456 との間の相互作用が弱い原因は、Arg456 の側鎖を固定している残基が周辺に存在しないためだと考えられた。加えて、CYP1A2-7ER においては、KL ループに位置する Arg456 が BC ループの Lys106 や Asp128 と相互作用することで、ヘムのポルフィリン環をタンパク質に結び付ける役割を担っているのではないかと考えられた。

以上の結果から、CYP1A2 と ANF の複合体構造における水分子の存在理由について考察する。CYP1A2-ANF は活性部位に結晶水を持たないが、平衡構造を得ることができた。それに対し、CYP1A2-ANF-WAT は平衡構造が得られず、かつリガンドと残基間の水素結合が弱いことがわかった。これらの結果から、結晶構造の活性部位において観

測された結晶水は CYP1A2 と ANF の複合体形成において必須ではない可能性が示唆された。特に、CYP1A2-ANF において ANF と残基間の相互作用が弱くなったことから、結晶構造の活性部位に存在した水分子は、基質認識には関与していない可能性が考えられた。この予想に対応して、CYP1A2-ANF の基質認識では、水分子を介することなく ANF と残基間に十分な水素結合が存在した。CYP1A2 の結晶構造で活性部位に水分子が存在した理由として、CYP は活性部位の空間が広く、CYP1A2 に限らず複数の分子種で水分子が活性部位に存在することが知られている。そのため、CYP1A2 の結晶構造で見られた水分子は、実験操作により偶然、活性部位に入り込んだ可能性が考えられた。活性部位に存在する水分子の役割としては、水酸化反応におけるプロトン移動など基質認識以外の役割を有している可能性がある [93–95]。ヘムの触媒サイクルに参与する水分子について検討することは古典論に基づいた研究手法で扱える範疇を超えており、今後、量子化学計算により検討を行うことを計画している。

III-4-4. 結論

本研究では、200 ns 以上の MD シミュレーションを行い、基質である 7ER と阻害剤である ANF をリガンドとして CYP1A2 の複合体構造を予測した。さらに、ANF との複合体構造については、その結晶構造で活性部位に存在した水分子の役割について検討するため、活性部位に水分子を含む構造と含まない構造の二種類を作成した。その結果から、基質である 7ER との複合体では、MD シミュレーションにより水分子が活性部位に入り込み、基質認識において働いていることが示唆された。それに対し、CYP1A2 と ANF との複合体では、基質認識に水分子を必要としない可能性が示唆された。水分子の役割としては、水酸化反応におけるプロトン移動やヘムの活性化状態の調節など基質認識以外の働きを持つ可能性がある。今後は、CYP の構造だけでなく量子化学計算などを用いて CYP の触媒サイクルについても検討を行う予定である。

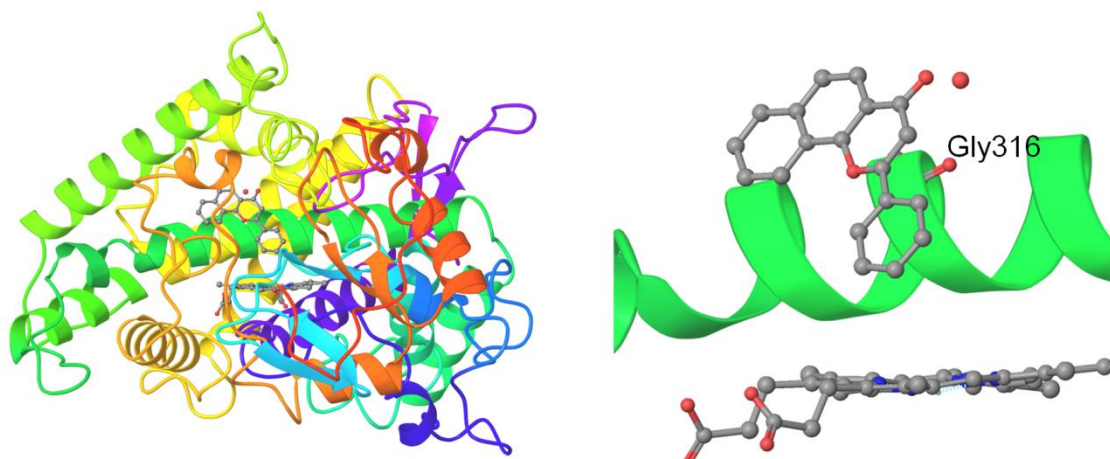


Figure III-4-1. Crystal structure of CYP1A2 complex with ANF (PDB ID: 2HI4) (A) overall structure (B) The enlarged figure of the active site. Heme, ANF, and Gly316 were shown in ball and stick diagram. The crystal water was shown in red sphere.

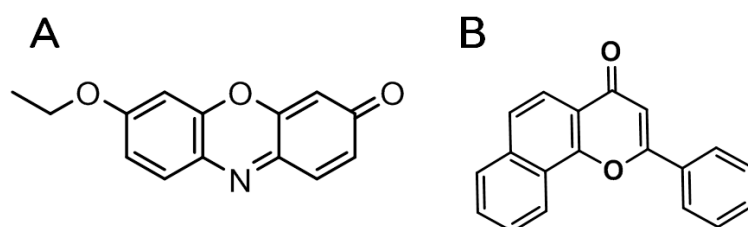


Figure III-4-2. Chemical structures of (A) 7-ethoxyresorufin and (B) ANF.

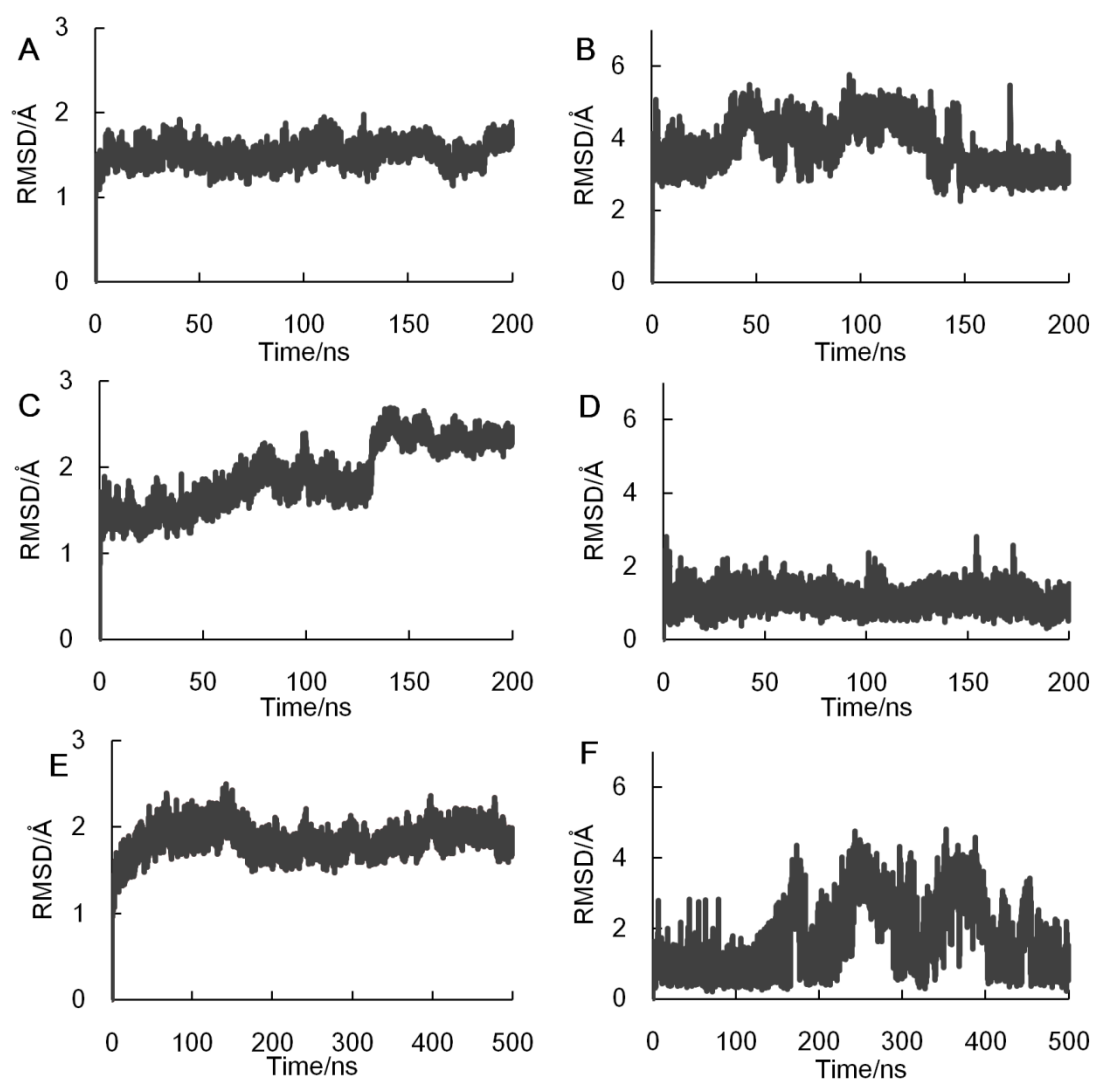


Figure III-4-3. RMSDs of (A,B) CYP1A2-7ER, (C,D) CYP1A2-ANF, and (E,F) CYP1A2-ANF-WAT. The RMSDs for the main chain atoms are shown in left and the RMSDs for the ligands are shown in right.

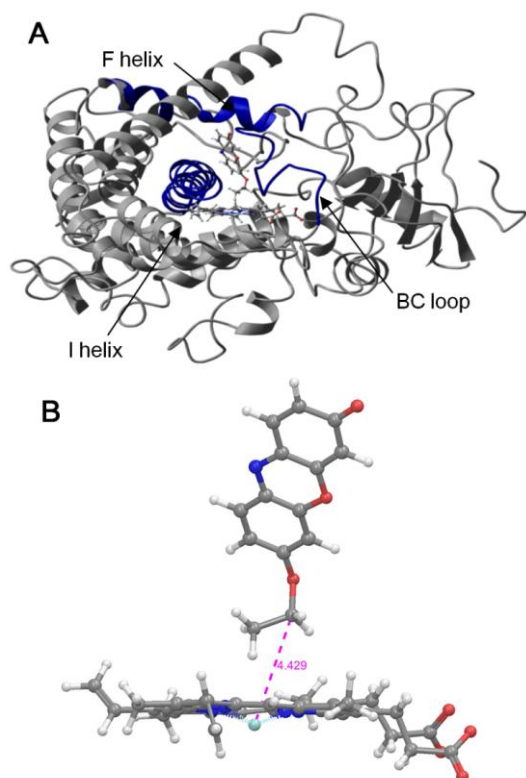


Figure III-4-4. Optimised complex structure with 7-ethoxyresorufin after MD simulation. (A) The overall structure. (B) Heme and 7ER in the active site. The substrate and heme was drawn in ball and stick diagram. BC loop, F and I helices were shown in black and the other resion was shown in gray.

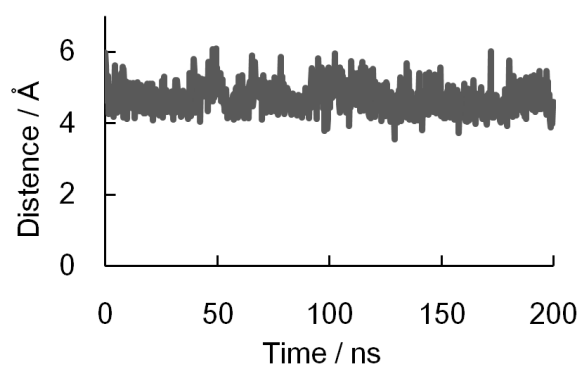


Figure III-4-5. Distance from heme iron to the carbon of the catalytic site for 7ER during 200 ns MD simulations for CYP1A2-7ER

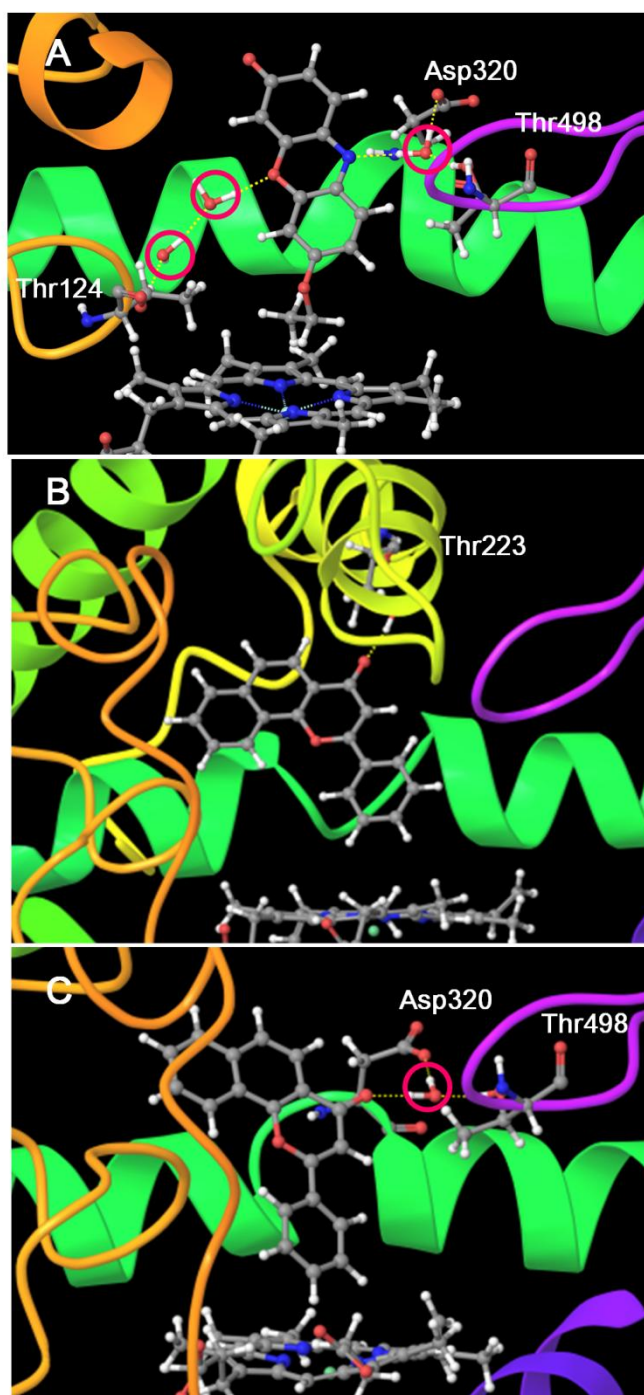


Figure III-4-6. Optimized structures of (A) CYP1A2-7ER, (B) CYP1A2-ANF, and (C) CYP1A2-ANF-WAT. Water molecules were circled. Residues involved in the hydrogen bonds network were labeled.

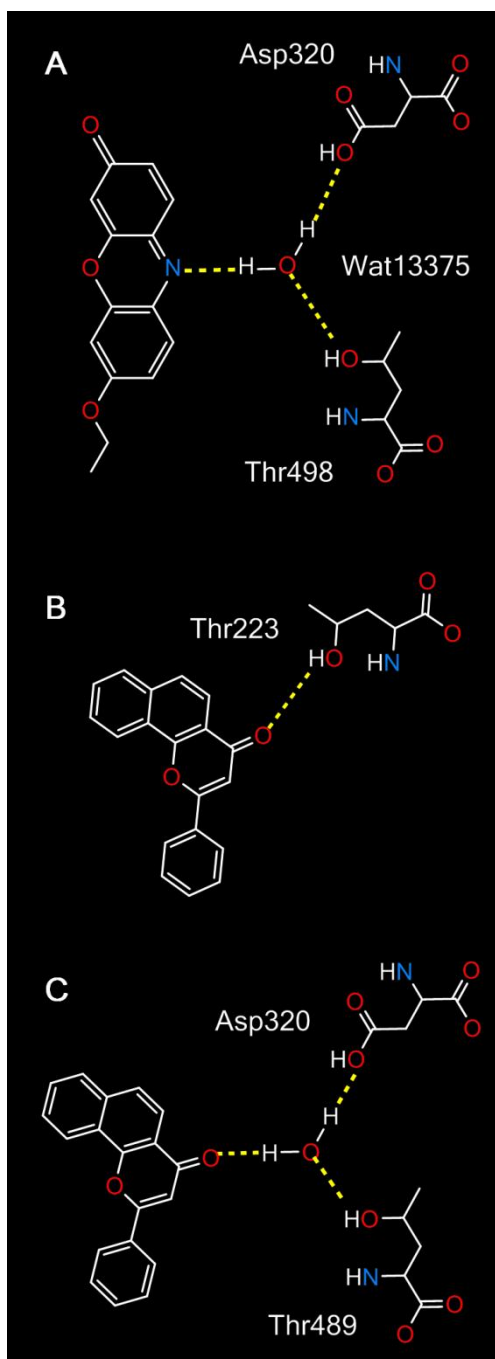


Figure III-4-7. Diagram of hydrogen bonds network in the active sites of (A) CYP1A2-7ER, (B) CYP1A2-ANF, and (C) CYP1A2-ANF-WAT.

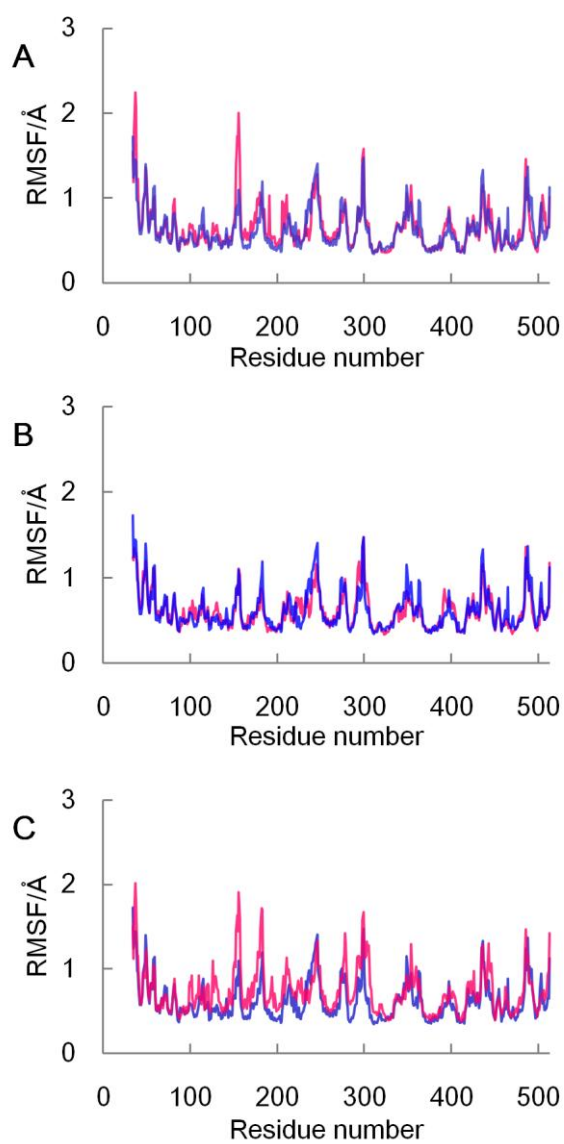


Figure III-4-8. Superposition of root mean square fluctuations of the α carbon atom of CYP1A2-7ER (blue) with (A) ligand-free CYP1A2 (magenta), (B) CYP1A2-ANF (magenta), (C) CYP1A2-ANF-WAT (magenta).

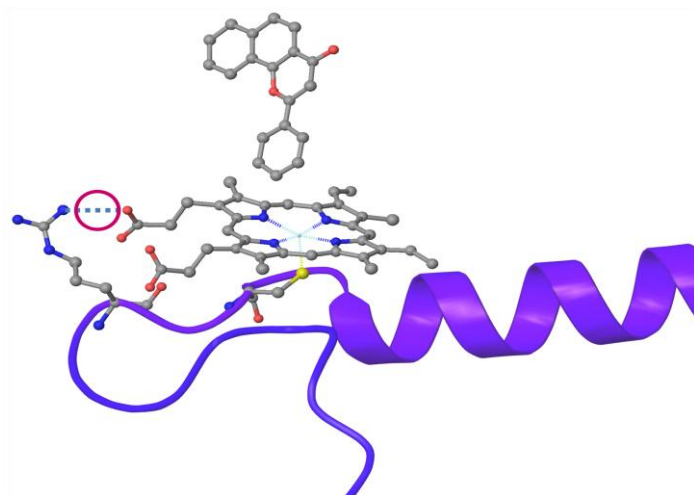


Figure III-4-9 Interaction between Arg456 and heme of the crystal structure for CYP1A2 with ANF.

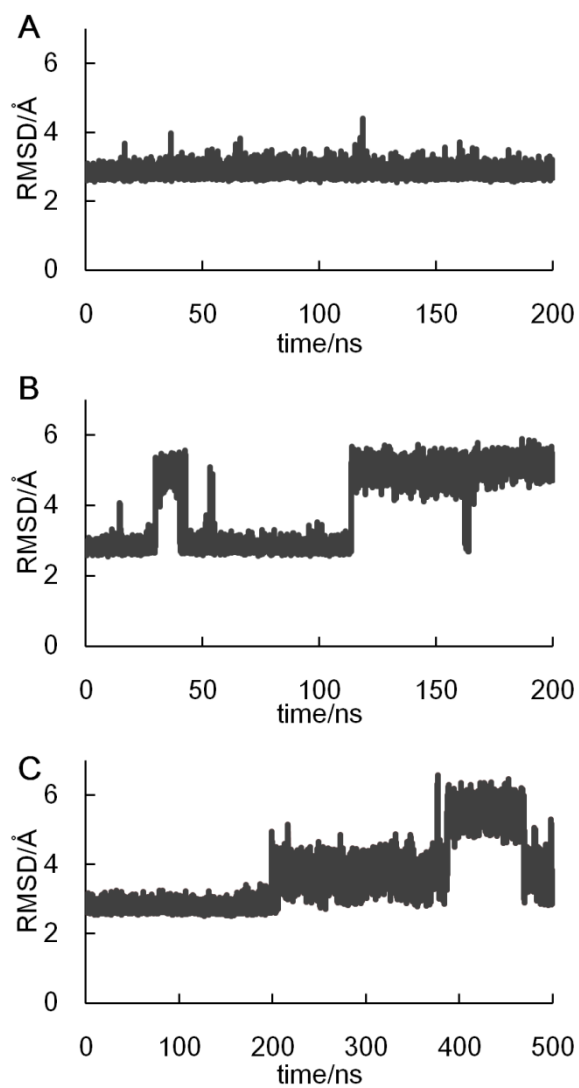


Figure III-4-10. Distance between the nitrogen atom of Arg456 and the oxygen atom of propionate of heme in CYP1A2 complex structures. (A) CYP1A2-7ER, (B) CYP1A2-ANF, and (C) CYP1A2-ANF-WAT.

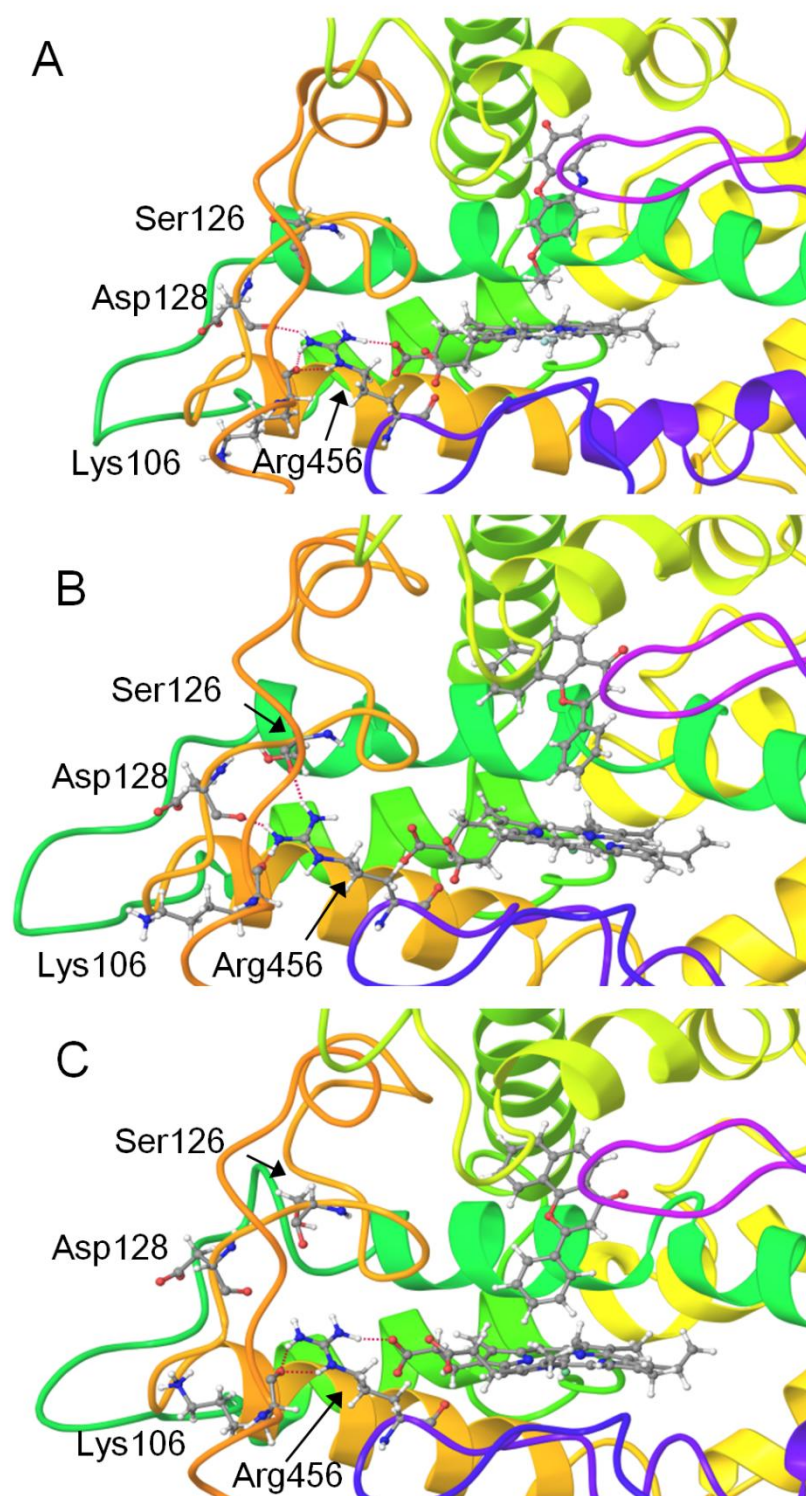


Figure III-4-11. Optimized structures of (A) CYP1A2-7ER, (B) CYP1A2-ANF, (C) CYP1A2-ANF-WAT. Residues interacting with Arg456, Lys106, Ser126, and Asp128 were labeled. Hemes, Lignds, and Residues were shown in stick and ball diagram.

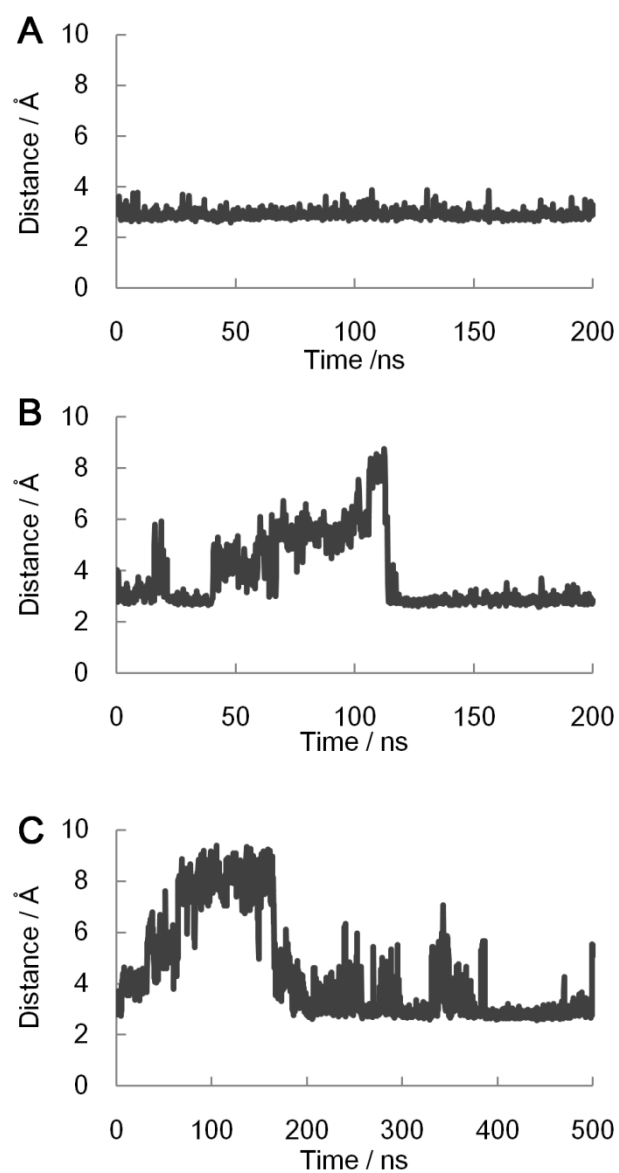


Figure III-4-12. Distance from the nitrogen atoms (NH₂) of Arg456 to the oxygen atoms of Lys106 for (A) CYP1A2-7ER, (B) CYP1A2-ANF, and (C) CYP1A2-ANF-WAT.

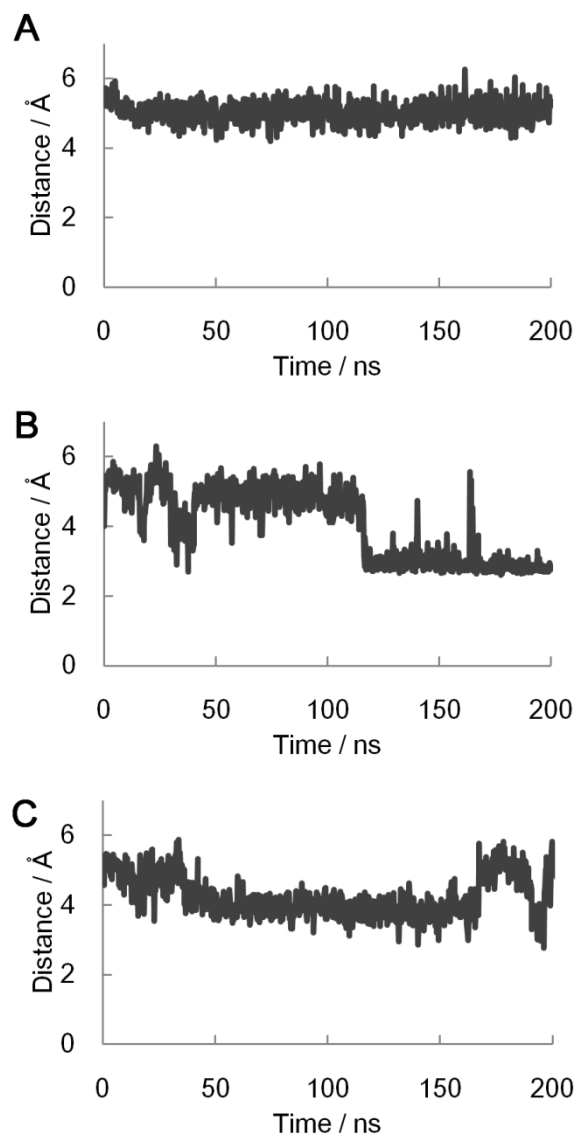


Figure III-4-13. Distance from the nitrogen atoms (NH₂) of Arg456 to the oxygen atoms of Ser126 for (A) CYP1A2-7ER, (B) CYP1A2-ANF, and (C) CYP1A2-ANF-WAT.

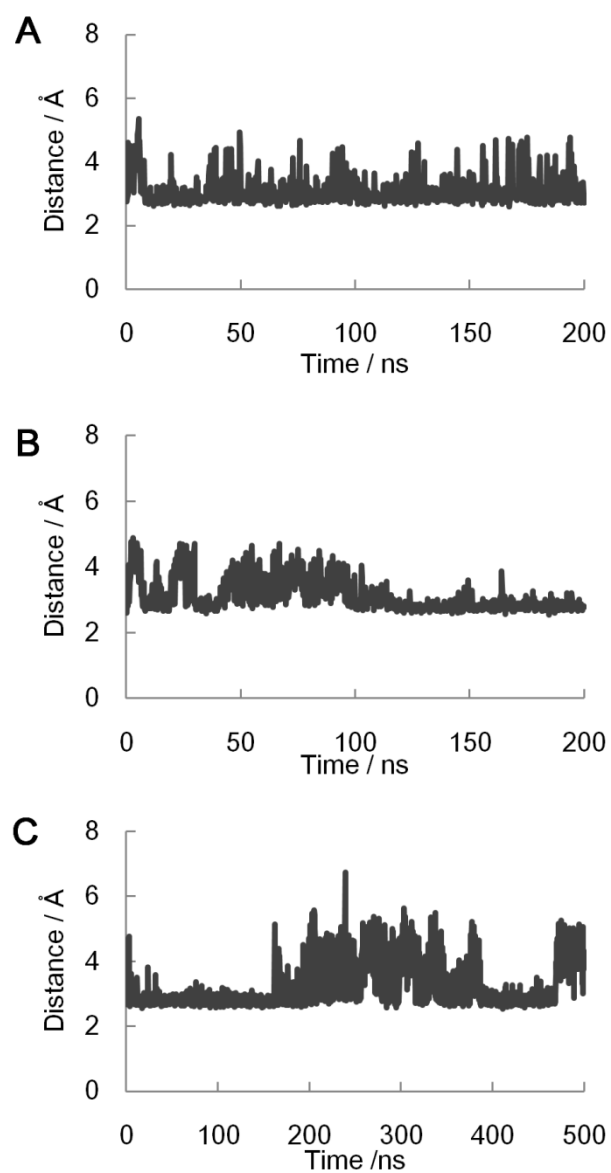


Figure III-4-14. Distance from the nitrogen atoms (NH₂) of Arg456 to the oxygen atoms of Asp128 for (A) CYP1A2-7ER, (B) CYP1A2-ANF, and (C) CYP1A2-ANF-WAT.

III-5. 野生型と遺伝子変異型 CYP1A2 と 7-エトキシレゾルフィンとの複合体構造における基質認識様式の違いに関する検討

III-5-1 序

第 III-3 節において一つのアミノ酸残基の置換がタンパク質の三次構造や構造柔軟性に影響を及ぼすことを示した。しかし、遺伝子変異の影響としては、立体構造や動的性質だけでなく、基質との複合体構造の形成や基質認識においても違いが生じることが予想される。一般に、疎水性の医薬品化合物が酵素の活性部位に結合する時には、疎水性相互作用が主な駆動力となる。一方で、その基質認識や基質選択性には、水素結合が大きく寄与する。既に、CYP2C19 や CYP2B6 では計算化学的手法により遺伝子変異により基質認識が失われる可能性が示唆されている [96,97]。いずれの研究においても、遺伝子変異型タンパク質では基質と残基との間の水素結合が野生型とは異なる可能性が示唆されている。本節における研究では遺伝子変異型 CYP1A2 の複合体構造を予測し、野生型 CYP1A2 複合体との基質認識における違いを調べた。本節における研究は既に得られている基質非結合型の遺伝子変異型 CYP1A2 の構造を利用し、基質との複合体構造を作成している。基質との結合が起こる時、CYP タンパク質は誘導適合により構造が大きく変化しつつある状態にある。基質非結合型の遺伝子変異型 CYP1A2 の MD トラジェクトリには、熱により揺らいだ状態が記録されている。この MD トラジェクトリに含まれる構造を複合体構造の初期構造として利用することで、より複合体構造に適したタンパク質構造を得ることができると期待した。本節における研究の結果は、遺伝子変異型 CYP1A2 の構造活性相関をより詳細に理解することにつながると期待される。

III-5-2. 方法

本節で研究対象とした遺伝子変異型 CYP1A2 を Table III-5-1 に示す。

Table III-5-1. Wild-type and mutant CYP1A2 used for prediction of complex structures with 7-ethoxyresorufin and the experimentally determined enzymatic activities [36].

Gene	Protein	Mutation	Activity ^{a)}	Time/ns ^{c)}
CYP1A2*1	CYP1A2.1	–	Normal	200
CYP1A2*4	CYP1A2.4	Ile386Phe	N. D. ^{b)}	100
CYP1A2*6	CYP1A2.6	Arg431Trp	N. D. ^{b)}	150
CYP1A2*8	CYP1A2.8	Arg456His	N. D. ^{b)}	100
CYP1A2*11	CYP1A2.11	Phe186Leu	Decreased	100
CYP1A2*13	CYP1A2.13	Gly299Ser	Normal	100
CYP1A2*14	CYP1A2.14	Thr438Ile	Increased	100
CYP1A2*15	CYP1A2.15	Pro42Arg	Decreased	150
CYP1A2*16	CYP1A2.16	Arg377Gln	N. D. ^{b)}	100

a) 7-ethoxyresorufin *O*-deethylation activities

b) not detectable

c) time taken for MD simulations

野生型である CYP1A2.1 に加え、CYP1A2.4、CYP1A2.6、CYP1A2.8、CYP1A2.11、CYP1A2.13、CYP1A2.14、CYP1A2.15、CYP1A2.16 に対してドッキングと MD シミュレーションを行った。Table III-5-1 には、それぞれの変異体におけるアミノ酸残基の置換と MD シミュレーション時間も示した。

遺伝子変異型 CYP1A2 の複合体構造の初期構造はドッキングにより作成した。ドッキングの対象には第 III-3 節における基質非結合型構造の MD トラジェクトリを用いた。遺伝子変異型 CYP1A2 の中には 100 ns 以上の MD シミュレーションを行ったものもあるが、条件を統一させるため 0~100 ns の MD トラジェクトリを用いた。ドッキングの操作としては、まず 100 ns の MD トラジェクトリから 5 ns 毎に 21 個の構造を抽出して初期構造の候補とした。これらに対し、7ER を基質として GOLD でドッキングを行い、それぞれ 10 個ずつドッキングポーズを得た。そのなかから、7ER の酸化部位であるエトキシ基がヘムに近く、かつドッキングスコアが最も高いものを複合体構造の初期構造とした。それぞれの複合体に対して、300 K の定圧下、100 ns 以上の MD シミュレーションを行った。ドッキングプログラムには GOLD 5.2.2 [114]を用い、それ以外の計算条件は第 III-3 節における計算方法と同じ条件を用いた。

MD シミュレーションにより予測されたそれぞれの複合体の三次構造を評価するため、ペプチド主鎖の RMSD とリガンドの RMSD を算出した。RMSD の参照構造として

は、昇温 MD シミュレーション後の構造を用いた。また、残基の構造柔軟性を評価するため、C α 原子の RMSF を算出した。RMSF 計算の参照構造には、MD トラジェクトリの最後の 20 ns の平均構造を用いた。RMSD と RMSF の計算には、AmberTools12 の cpptraj モジュールを用いた。

III-5-3. 結果と考察

野生型である CYP1A2.1 と 7ER との複合体は 200 ns の MD シミュレーションによって、酵素反応に矛盾しない立体構造を得ることができた。一方で、遺伝子変異型 CYP1A2 と 7ER との複合体については、CYP1A2.4、CYP1A2.8、CYP1A2.11、CYP1A2.13、CYP1A2.14、CYP1A2.16 の 6 種類には 100 ns の MD シミュレーションを、CYP1A2.6 と CYP1A2.15 の 2 種類には 150 ns の MD シミュレーションを行った。これら 8 種類の遺伝子変異型 CYP1A2 複合体の RMSD を Figure III-5-1 に示す。また、それぞれの MD トラジェクトリを用いて、ヘム鉄から 7ER のエトキシ基の酸化部位炭素までの距離を測ったものを Figure III-5-2 に示す。加えて、MD シミュレーション後に算出した RMSF を Figure III-5-3 に示す。

CYP1A2.4 と 7ER 複合体については、100 ns の MD シミュレーションにより、タンパク質とリガンド共に、RMSD が収束していた (Figure III-5-1A)。このことから、CYP1A2.4 と 7ER の複合体は平衡構造が得られたと考えられた。CYP1A2.4 は活性の低下が報告されている変異体であるが、ヘム鉄から 7ER の酸化部位までの距離も 4~6 Å であり、酵素反応の進行に有利な構造であると考えられた (Figure III-5-2A)。加えて、構造柔軟性も野生型である CYP1A2.1 に比べ大きな違いが見られなかった (Figure III-5-3A)。MD シミュレーション後に最適化を行った際の CYP1A2.4 複合体構造を Figure III-5-4 に示す。CYP1A2.4 の活性部位には、一つの水分子が存在し、Asp313 の側鎖カルボニル基酸素と 7ER のカルボニル基酸素の間に水素結合を形成していた。また、7ER のカルボニル基酸素と Thr118 が水素結合を形成していた。Thr118 は BC ループ、Asp313 は I ヘリックスの残基であるため、どちらも基質認識部位として考えられている領域に存在する。けれども、野生型である CYP1A2.1 と 7ER の複合体においては、基質認識に働く残基は Asp320 と Thr498 であったため、基質認識において働く残基に違いが見られる (第 III-4 節 Figure III-4-6A)。このような違いが生じた原因として、CYP1A2.4 の変異である Ile386Phe が活性部位に空間的に近いことが考えられる (第 III-3 節 Figure III-3-3A and III-3-4D)。CYP1A2 は、多環芳香族炭化水素を代表としてテオフィリンやプロプラノロール、フルタミドなど芳香環を持つ基質を多く代謝する。それに対応するように、CYP1A2 の活性部位も芳香環を持つフェニルアラニンが多く存在する (Figure III-5-5)。CYP1A2.1 複合体においては、Phe125、Phe226、Phe253、Phe256、Phe260、Phe319 の 6 種類のフェニルアラニンが活性部位を構成している。そのうち、Phe226 と Phe319 は 7ER の芳香環の一つを挟み込むように位置するため、 π - π 相互作用が存在する可能性

が考えられる。この Phe226 と Phe319 による相互作用は CYP1A2.4 複合体においては存在しなかった (Figure III-5-6)。その代わりに、CYP1A2.4 複合体では変異箇所である Phe386 と Phe125 との間に π - π 相互作用が存在する可能性が示唆された (Figure III-5-7)。立体的に嵩高い Phe386 が Phe125 と相互作用することで活性部位の空間が押されたために、基質の結合様式に差異が生じたと考えられた。これらのことから、CYP1A2.4 の活性低下の原因の一つには、Ile386Phe の変異が周辺残基との相互作用を通して活性部位の環境を変えてしまったことにあるのではないかと考えられた。Ile386Phe の変異が、 π 電子による相互作用を介して活性部位の空間のサイズや形を変えた可能性がある。これらのことから、CYP1A2.4 が複合体を形成するためには野生型とは異なる相互作用が存在する必要があることが示された。そのため、CYP1A2.4 では野生型に比べ複合体形成が困難である可能性が考えられた。

CYP1A2.6 複合体には 150 ns の MD シミュレーションを行った。その結果、タンパク質とリガンドの RMSD が収束しており、平衡構造が得られたものと考えられた (Figure III-5-1B)。ヘム鉄から酸化部位のエトキシ基炭素までの距離は平衡構造が得られた 130~150 ns の間で平均 5.47 Å であった (Figure III-5-2B)。CYP1A2.1 と 7ER 複合体の距離は平均 4.68 Å であったため、ヘム鉄から酸化部位までの距離がやや離れていることがわかった。さらに、CYP1A2.6 複合体の MD シミュレーション後の最適化構造では、7ER のカルボニル基炭素と G ヘリックスの Asn257 が水素結合を形成していることがわかった (Figure III-5-8A)。7ER と Asn257 の間に形成された水素結合の出現率を、平衡構造が得られている 130-150 ns の MD トラジェクトリを用いて求めたところ、83 % の確率で水素結合が形成されていることがわかった。野生型である CYP1A2.1 複合体には Asp320 と Thr498 との間に水分子を介して 41 % の確率で水素結合が形成されていた。そのため、CYP1A2.6 複合体における 81 % という頻度は野生型に比べてかなり高く、7ER が活性部位に強く結合していることが考えられる。Asn257 との水素結合は、CYP1A2.6 だけでなく、CYP1A2.15 複合体や CYP1A2.16 複合体においても存在した (Figure III-5-8B and III-5-8C)。CYP1A2.15 複合体と CYP1A2.16 複合体はそれぞれ 150 ns、100 ns の MD シミュレーションを行った。これらの複合体についてもリガンドとタンパク質の RMSD が収束していることから、平衡構造が得られていると考えられた (Figure III-5-1G and III-5-1H)。CYP1A2.15 複合体と CYP1A2.16 複合体についても Asn257 と 7ER の間の水素結合を最後の 20 ns で求めると、CYP1A2.15 複合体において 81 %、CYP1A2.16 複合体において 70 % といずれも高いことがわかった。さらに、MD トラジェクトリの最後の 20 ns でヘム鉄から酸化部位の炭素までの距離を調べたところ、CYP1A2.15 複合体では 6.29 Å と距離が離れていることがわかった (Figure III-5-2G)。CYP1A2.16 複合体においては MD シミュレーション開始直後から 10 Å を超えており、酵素反応が起こり得ない可能性が示唆された (Figure III-5-2H)。Asn257 が存在する G ヘリックスは、活性部位の真上に存在する F ヘリックスの上に覆いかぶさるように位置しているため、G ヘリ

ックスの Asn257 と相互作用することで 7ER がヘムから遠ざかってしまった可能性がある。CYP1A2.6、CYP1A2.15、CYP1A2.16 の三つの複合体について Asn257 以外の周辺残基との相互作用を調べると、Phe260 が 7ER の芳香環と π - π 相互作用をしている可能性が示唆された。例として、CYP1A2.16 複合体の MD シミュレーション後の最適化構造を Figure III-5-9 に示す。Phe260 は G ヘリックスに存在する残基であり、Phe260 による相互作用は野生型である CYP1A2.1 複合体では存在しなかった。また、野生型において見られた Phe226 との相互作用は存在していたが、Phe319 からの距離は離れていた。Phe260 による相互作用も、CYP1A2.6 と CYP1A2.15、CYP1A2.16 の複合体における特殊な 7ER の配向に寄与していると考えられた。これら三つの複合体の中で、CYP1A2.16 複合体では 7ER からヘムまでの距離が特に離れている。その原因として、CYP1A2.16 複合体では Ile386 の側鎖が 7ER のエトキシ基がヘムに近づくことを妨げている可能性が考えられた (Figure III-5-9)。野生型の CYP1A2.1 複合体には Ile386 は活性部位のすぐそばに存在するが、その側鎖は 7ER のエトキシ基のアルキル部分と疎水性の相互作用をしているだけで立体障害にはならなかった。CYP1A2.16 複合体の 7ER の結合様式が野生型の結合様式に比べて大きくずれていたために、CYP1A2.16 複合体では Ile386 の側鎖が立体障害となったと考えられた。さらに、CYP1A2.16 複合体では、ヘムと 7ER の間に複数の水分子が入り込んでいた。ヘムの触媒サイクルにおいて、水分子は不活化状態にあるヘムの第六配位子として機能するが、活性化状態のヘムに対しては水分子自体が基質となることで触媒反応を妨げる可能性がある。これらの結果から、CYP1A2.6、CYP1A2.15、CYP1A2.16 は、複合体を形成するためには野生型とは異なる相互作用や基質認識が存在する必要があると考えられ、そのため複合体形成が困難なのではないかという可能性が示唆された。加えて、CYP1A2.16 複合体においては、ヘムの触媒機能も正常に働かない可能性が示唆された。

CYP1A2.6 (Arg431Trp)、CYP1A2.15 (Pro42Arg)、CYP1A2.16 (Arg377Gln) の三つの複合体について RMSF を求めたところ、CYP1A2.1 複合体の RMSF とは異なっていることがわかった。CYP1A2.1 複合体の RMSF に比較すると、CYP1A2.6 複合体においては、CD ループの Ser156 で 0.75 Å、C 末端ループの Lys487 で 1.14 Å 高いことがわかった (Figure III-5-3B)。加えて、CYP1A2.15 複合体においては、Gly102 において 1.00 Å 高く (Figure III-5-3G)、CYP1A2.16 複合体においては、Ser212 において 2.02 Å 高かった (Figure III-5-3H)。CYP1A2.6 複合体、CYP1A2.15 複合体、CYP1A2.16 複合体に共通することとして、その遺伝子変異によりアミノ酸の極性が大きく変わっていることが挙げられる。これら三つの遺伝子変異はいずれもアルギニンが関与した変異である。アルギニンのグアニジノ基が形成する水素結合が大きく変化した結果として、複合体構造全体が影響を受けたと考えられた。構造柔軟性の差異もアミノ酸残基の変異により変化した水素結合が、全体構造に伝播した結果ではないかと考えられた。CYP1A2.6 (Arg431Trp) と CYP1A2.15 (Pro42Arg) の変異は比較的溶媒露出面のループに存在しており、アミノ

酸残基の変異が立体障害となってタンパク質の構造や柔軟性に影響したとは考えにくい。さらに、CYP1A2.16 (Arg377Gln) の変異はタンパク質コアに位置するものの、立体的に小さな残基に置換しているため残基の嵩高さによるタンパク質の構造変化は考えにくい。以上から、CYP1A2.6 複合体、CYP1A2.15 複合体、CYP1A2.16 複合体においては、アルギニンの変異により周辺残基との水素結合が大きく変わったことが、複合体形成や動的性質に差異をもたらした一番の原因であると考えられた。

CYP1A2.8 複合体は 100 ns の MD シミュレーションにより平衡構造が得られた (Figure III-5-1C)。CYP1A2.8 複合体の MD シミュレーション後の最適化構造では 7ER の酸化部位であるエトキシ基はヘム鉄の方に向いており、酵素反応に有利な複合体構造であると考えられた (Figure III-5-10)。しかし、その MD シミュレーション後の CYP1A2.8 複合体の最適化構造では、7ER と水素結合を形成している残基が存在しなかった。このことは、CYP1A2.8 複合体の構造は 7ER を基質として認識できない可能性を示唆している。また、CYP1A2.8 複合体の構造柔軟性については Ser156 の RMSF が CYP1A2.1 複合体に比べ 1.61 Å 高い (Figure III-5-3C)。CD ループはヘムと相互作用のある C ヘリックスに続くループであるので、CD ループの構造柔軟性の変化は、レドックスパートナーとの相互作用に影響があるのではないかと考えられた。野生型の CYP1A2.1 と 7ER との複合体では、Arg456 はヘムのプロピオン酸だけでなく BC ループの Lys106 と Asp128 とも相互作用することでヘムをタンパク質に結び付ける役割を担っていると考えられた (第 III-4 節参照)。しかし、CYP1A2.8 複合体では、Arg456His の変異によりヘムと His456 の間の相互作用がないだけでなく、Asp128 と Lys106 との間の相互作用は存在しない可能性が示唆された (Figure III-5-11)。このことから、CYP1A2.8 複合体においてヘムが固定されずに不安定な状態にある可能性が示唆された。

CYP1A2.11 複合体は、7ER に対する酵素活性が野生型に比べ 24 % まで低下していることが報告されている [36]。7ER を基質としてドッキングを行った結果、CYP1A2.11 複合体では 7ER の酸化部位であるエトキシ基がヘム鉄の真上に位置しており、酵素反応に矛盾しないドッキングポーズが得られた (Figure III-5-12)。この複合体構造を初期構造として 100 ns の MD シミュレーションを行ったところ、タンパク質とリガンドともに RMSD が収束しており、複合体構造の平衡状態が得られたと考えられた (Figure III-5-1D)。しかし、MD シミュレーション後の最適化構造では 7ER の配向が初期構造から大きくずれて、エトキシ基からヘムまでの距離が離れていることがわかった (Figure III-5-13)。CYP1A2.11 複合体で 7ER が特異的な配向となった原因としては、Asn312 が 7ER と相互作用することで安定化に寄与していると考えられた。また、MD トラジェクトリの全体で、ヘムからエトキシ基までの距離を測ったところ、その距離は MD シミュレーションの開始直後から 10 Å を超えており、MD シミュレーション全体で酵素反応が進行しにくい複合体構造となっている可能性が考えられた。これらの計算結果は、CYP1A2.11 は基質との適切な複合体を形成できない可能性を示している。しかし、実験

的には CYP1A2.11 は 7ER に対する活性を 24 % 保持しているため、実験結果に対応する計算結果を得ることができなかった。CYP1A2.11 複合体は、MD シミュレーション開始直後において、既に 7ER の配向が初期構造からずれてしまっていた。このことから、CYP1A2.11 の複合体構造を予測することができなかった原因としては、初期構造の選択を誤った可能性が考えられる。複合体構造の初期構造は、基質非結合型の CYP1A2.11 の 100 ns のトラジェクトリを用いて作成している。基質非結合型の CYP1A2.11 は平衡構造を得るまでに 175 ns の MD シミュレーションを必要とした。そのため、そのうちの 0~100 ns のトラジェクトリでは、基質非結合型 CYP1A2.11 の平衡構造は得られておらず、野生型 CYP1A2 のタンパク質にアミノ酸置換を加えたことによるひずみが解消されていなかった可能性が考えられる。ひずみのある構造を初期構造として利用としたことが、7ER との複合体構造に影響したのではないかと考えられる。

CYP1A2.13 複合体はタンパク質の RMSD が 100 ns の MD シミュレーションを行っても上昇を続けており、平衡構造を得ることができなかった (Figure III-5-1E)。CYP1A2.13 複合体は、活性が野生型に比べ 70 % 保持していることが報告されている [36]。CYP1A2.13 複合体の初期構造作成で 7ER を基質にドッキングを行った際には、7ER のエトキシ基がヘム鉄の方に向いており、酵素反応に矛盾しない複合体構造が得られていた (Figure III-5-14)。しかし、この CYP1A2.13 と 7ER 複合体について構造最適化と MD シミュレーションを行ったところ、基質の配向が初期構造と大きく異なっていることがわかった (Figure III-5-15)。CYP1A2.13 複合体構造では Asp320 が 7ER との間に水素結合を形成しており、基質認識に働いていると考えられた。しかし 7ER は活性部位内部に収まっているものの、その結合様式は酸化部位であるエトキシ基がヘムから大きく離れおり、酵素反応が進行するには適さない構造であった。この CYP1A2.13 複合体構造は平衡構造が得られていないことから、ドッキングにより予測した初期構造が酵素反応の進行に有利な構造ではなかった可能性が考えられた。第 III-4 節の研究結果からは、野生型である CYP1A2.1 は基質認識において水分子を利用する可能性が示唆されたが、複合体の初期構造を作成するために行ったドッキングでは水分子について考慮していなかったために 7ER のドッキングポーズを正確に予測することが難しかったのではないかと予想された。リガンドとタンパク質間の相互作用を水分子が仲介している場合に、どのように複合体構造を予測すべきか、ドッキング手法の改善を今後の課題としたい。

CYP1A2.14 複合体には 100 ns の MD シミュレーションを行った (Figure III-5-1F)。その結果、タンパク質とリガンドの RMSD が収束していたため、平衡構造が得られたと考えられた。ヘム鉄から 7ER の酸化部位炭素までの距離も MD シミュレーション全体で一定であり (Figure III-5-2F)、その最適化構造も酵素反応が進行しうる複合体構造であった (Figure III-5-16)。CYP1A2.14 の最適化構造では、BC ループの Thr118 の側鎖のヒドロキシ基水素と 7ER のカルボニル基酸素の間に水素結合が形成されていた。さらに、I ヘリックスの Gly316 のカルボニル基酸素と 7ER の窒素が水分子を介して水素結

合を形成していることがわかった。このことから、CYP1A2.14 複合体においては、Thr118 と Gly316 が基質認識において働くと考えられた。野生型である CYP1A2.1 複合体においても I ヘリックスの Asp320 と、BC ループの Thr124 が基質認識に関与する可能性が示唆されたため、CYP1A2.14 複合体の基質認識は野生型に似ていると考えられた。さらに、CYP1A2.14 複合体は RMSF についても CYP1A2.1 複合体に良く似ていることがわかった (Figure III-5-3F)。CYP1A2.14 は酵素活性の上昇が報告されている変異体である。本節における複合体構造の予測からは、CYP1A2.14 で活性が上昇した原因を予測することができなかった。しかし、CYP1A2.14 複合体は、少なくとも野生型と同等の酵素活性を有している可能性が示唆された。今後、ヘムの電子状態やレドックスパートナーからの電子伝達について量子力学計算により CYP1A2.14 の活性上昇の原因検討する予定である。

III-5-4. 結論

本節における研究では、8 種類の遺伝子変異型 CYP1A2 と 7ER の複合体構造の予測を行った。その結果、活性の低下が報告された遺伝子変異型 CYP1A2 では、酵素反応に適する複合体構造が得られないという結果が得られた。例として、CYP1A2.4 複合体構造では 7ER と残基間に水素結合が形成されておらず、基質認識が働いていない可能性が示唆された。CYP1A2.16 複合体では活性部位内の 7ER がヘムから大きく離れ、酵素反応が起こりにくい構造となっていることが示唆された。また、CYP1A2.16 複合体の活性部位では基質とヘムの間に水分子が存在しており、7ER の代謝反応が水分子により妨げられる可能性が示唆された。CYP1A2.4 や CYP1A2.16 といった酵素活性が著しく低下している変異体では、複合体を形成するためには野生型とは異なる相互作用や基質認識が存在する必要がある、そのため複合体形成が困難なのではないかという可能性が示唆された。本節における研究の結果から、一つのアミノ酸残基の変異が活性部位の周辺の環境を変え、基質の配向や基質認識に影響することが示唆された。一方で、CYP1A2.13 複合体は活性低下がほとんどない変異体だが、酵素反応に適した複合体構造が得られなかった。CYP1A2 は基質認識において水分子を利用する可能性があることから、ドッキングを利用した初期構造の作成において水分子の影響を考慮する必要があるのではないかと考えられた。また、CYP1A2.14 複合体は活性の上昇が報告されている変異体であるが、その活性が上昇する明確な理由は立体構造や構造柔軟性の比較からは予測することができなかった。これらのことから、基質認識において働く水分子を考慮に入れたドッキングを行うことと、ヘムの電子状態を理解するために量子力学計算の手法を取り入れることを今後の課題として計画している。

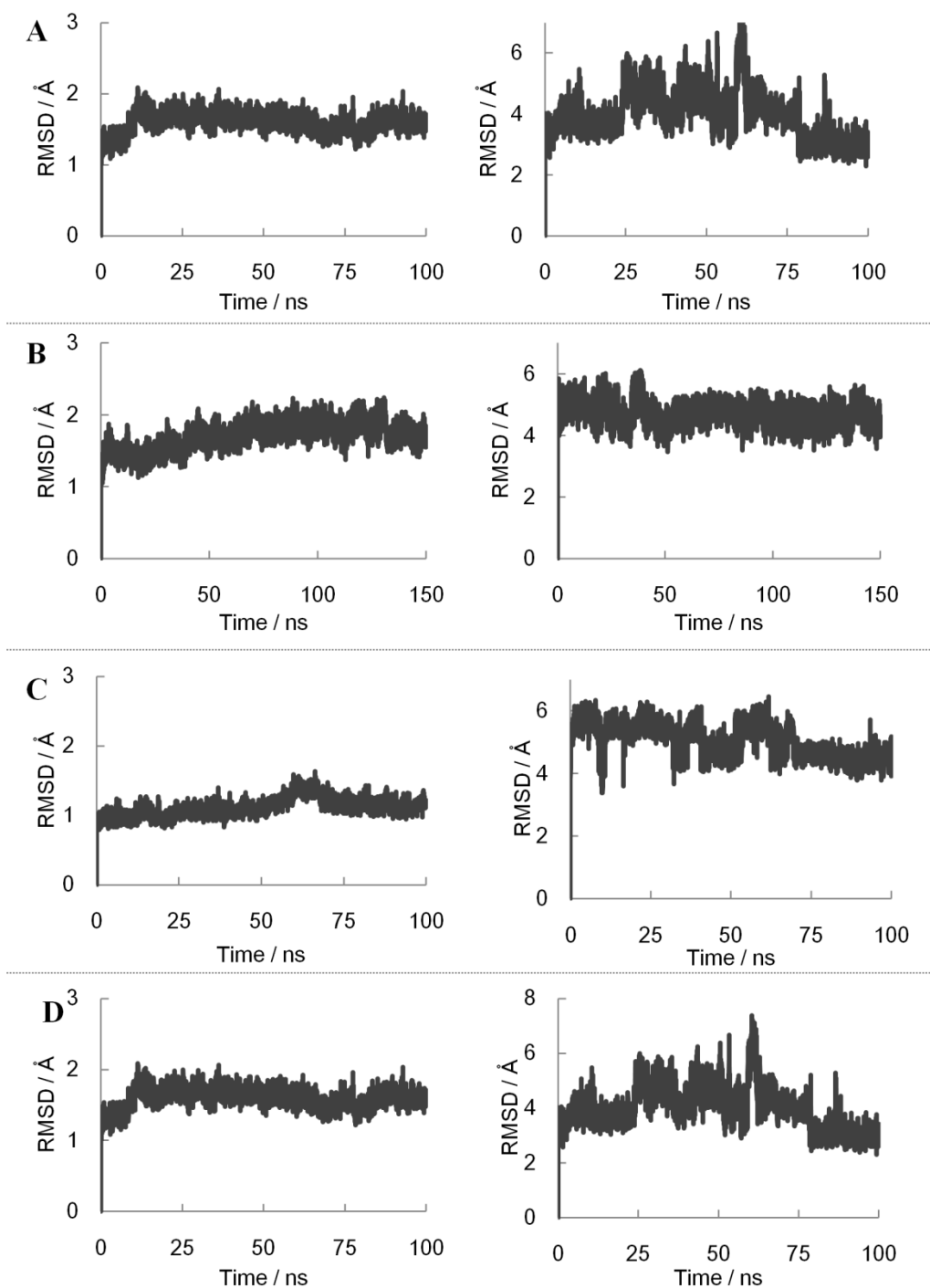
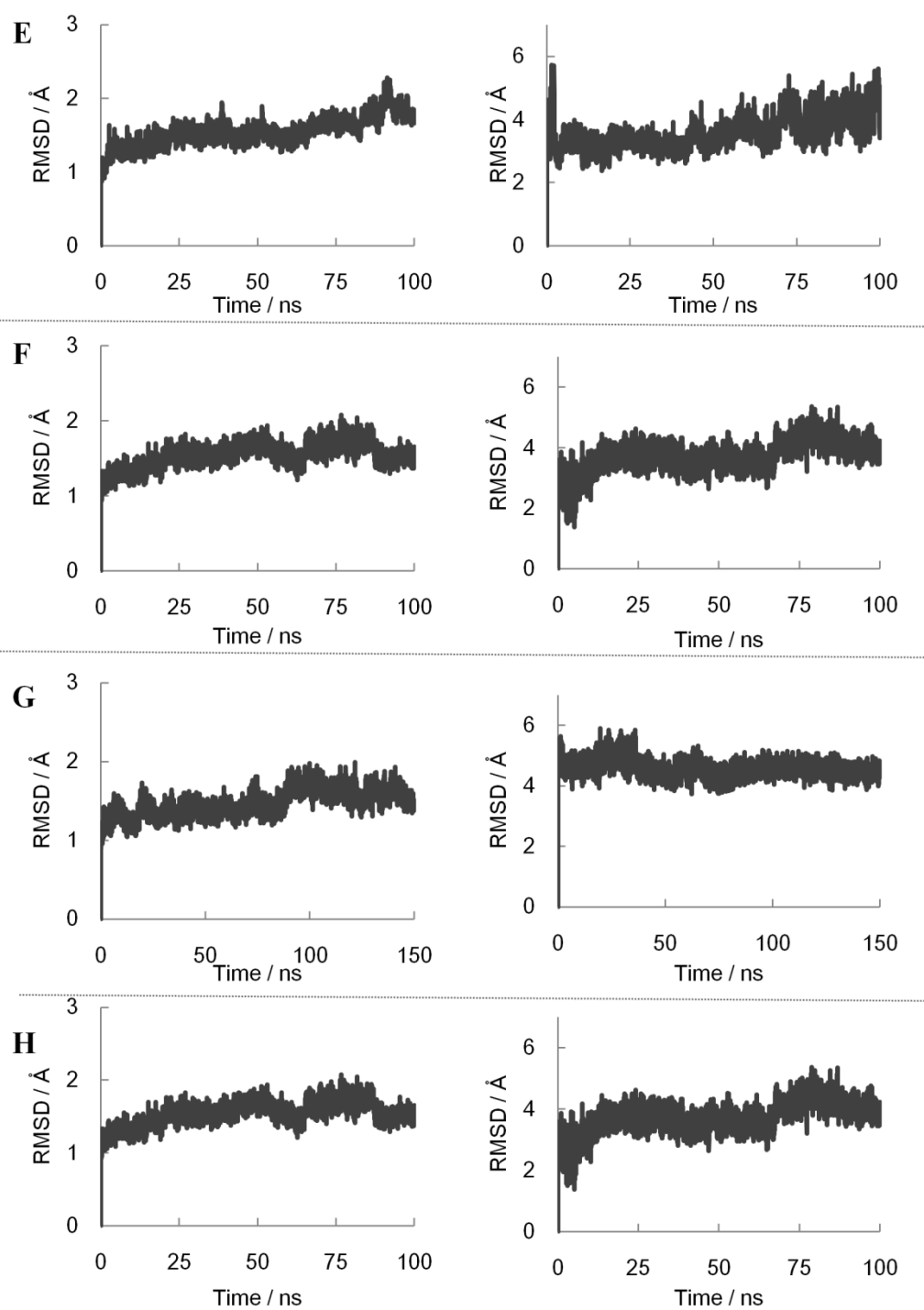


Figure III-5-1. RMSDs for the complex of mutant CYP1A2 with 7ER. (A) CYP1A2.4 (B) CYP1A2.6 (C) CYP1A2.8 (D) CYP1A2.11 (E) CYP1A2.13 (F) CYP1A2.14 (G) CYP1A2.15 (H) CYP1A2.16. The RMSDs for protein were shown in left column and the RMSDs for ligand were shown in right column. It continued on the next page.



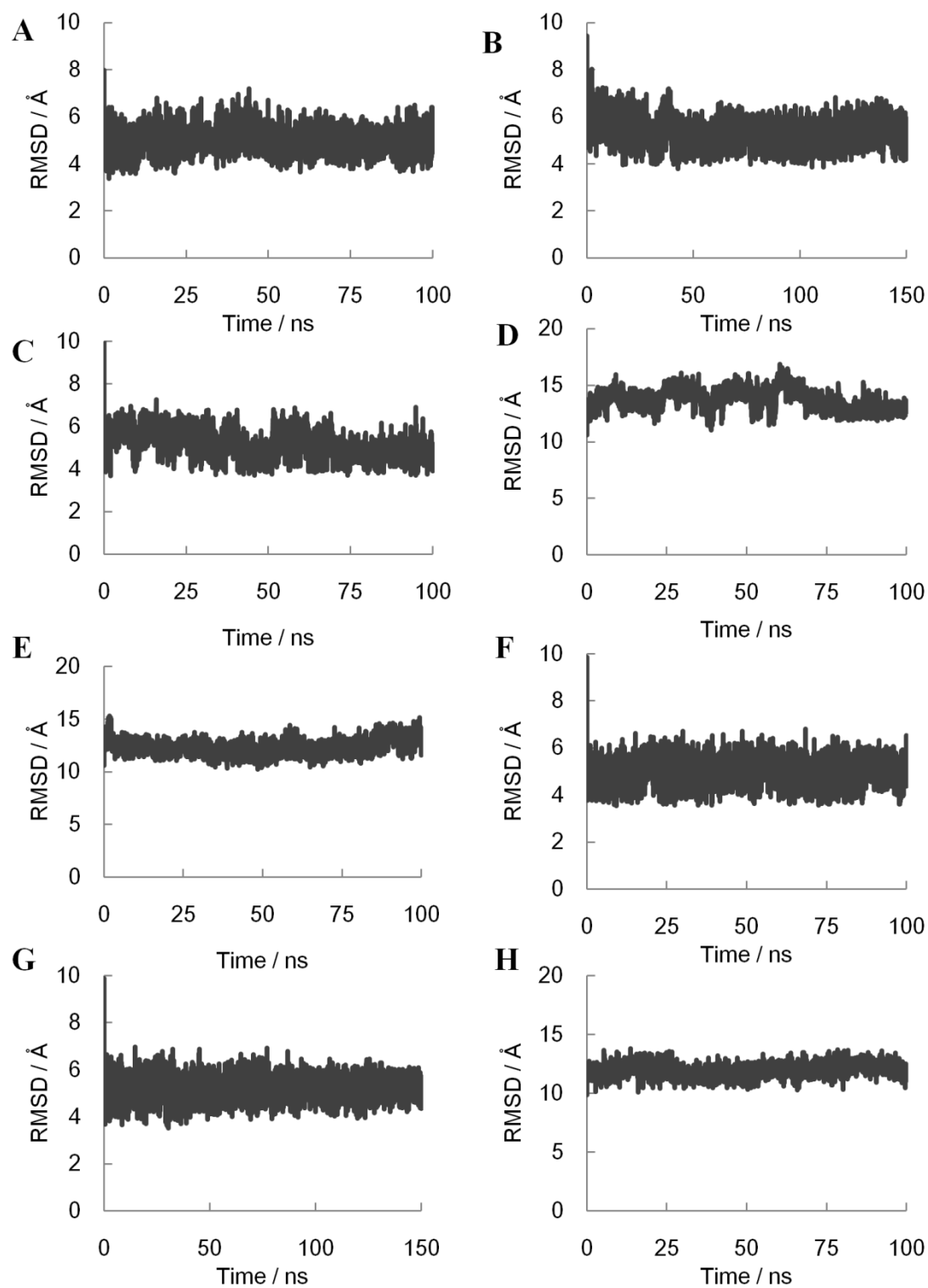


Figure III-5-2. Distance from heme iron to the carbon of the catalytic site for 7ER in the complex structures for (A) CYP1A2.4, (B) CYP1A2.6, (C) CYP1A2.8, (D) CYP1A2.11, (E) CYP1A2.13, (F) CYP1A2.14, (G) CYP1A2.15, (H) CYP1A2.16.

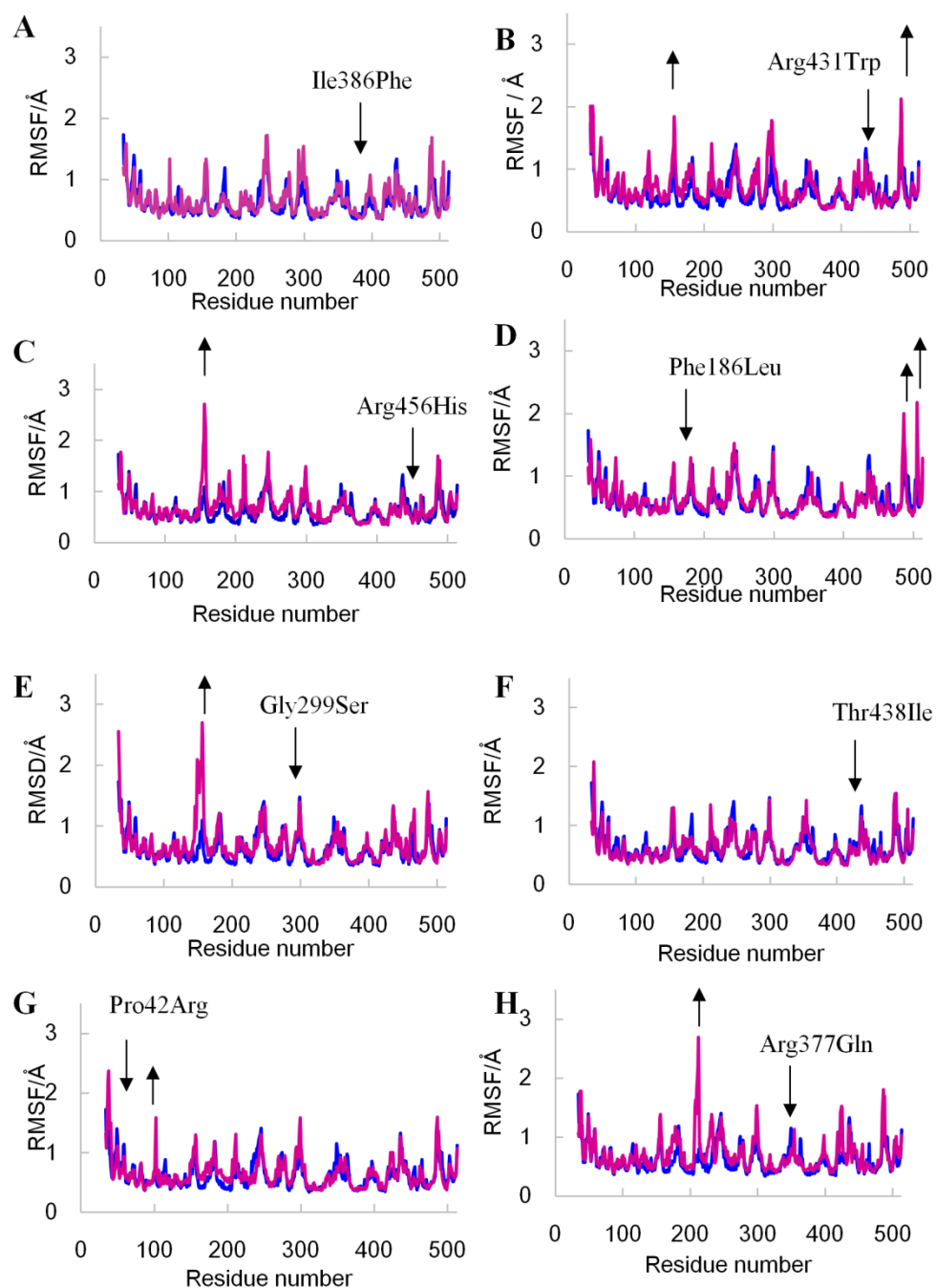


Figure III-5-3. Superposition of root mean square fluctuations of the α carbon atom of CYP1A2.1 complex (blue) with mutant CYP1A2 complex (magenta). (A) CYP1A2.4, (B) CYP1A2.6, (C) CYP1A2.8, (D) CYP1A2.11, (E) CYP1A2.13, (F) CYP1A2.14, (G) CYP1A2.15, (H) CYP1A2.16. Amino acid residues which have higher flexibilities over 0.6 Å than that of wild-type are pointed by arrows. The mutation positions are also pointed by arrows.

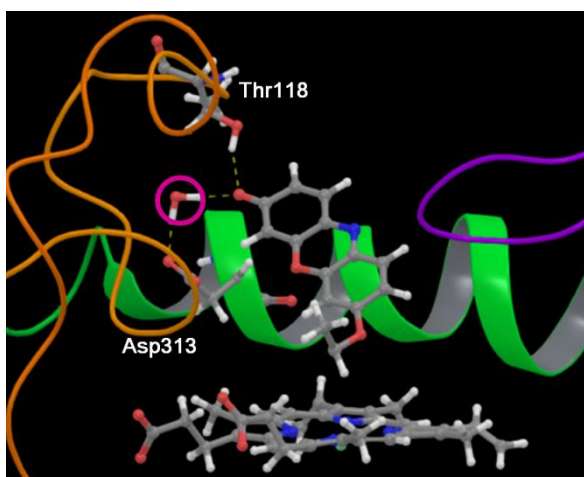


Figure III-5-4. Optimized structure of CYP1A2.4 complex. Water molecule was circled. Residues forming the hydrogen bonds network were shown and labeled.

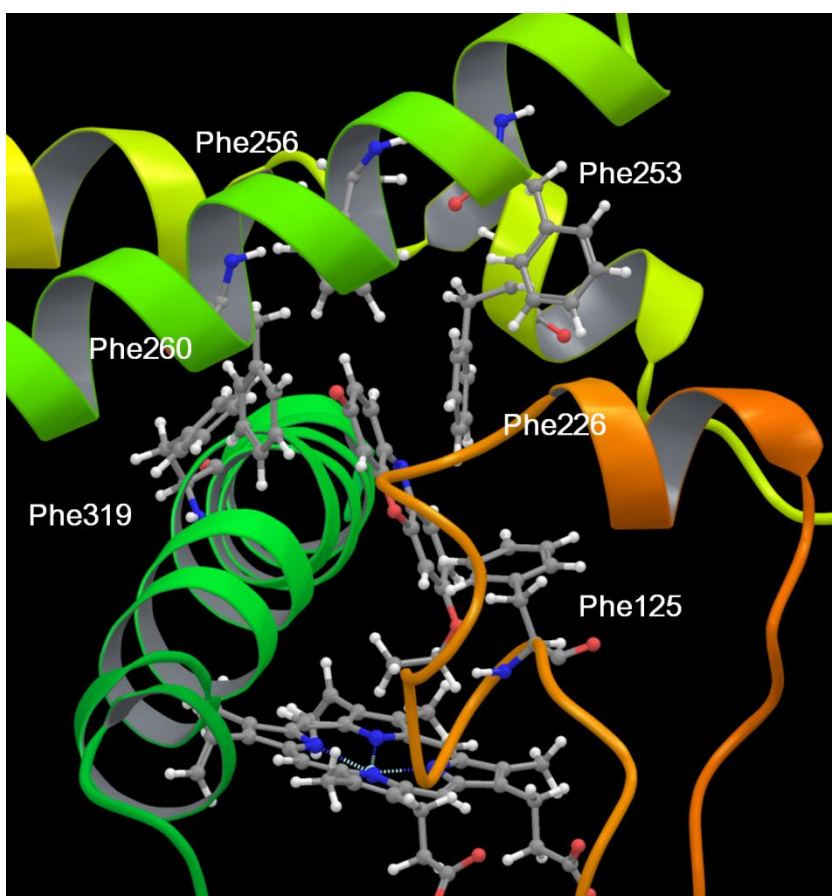


Figure III-5-5. Phenylalanines surrounding 7ER in the active site of CYP1A2.1 complex.

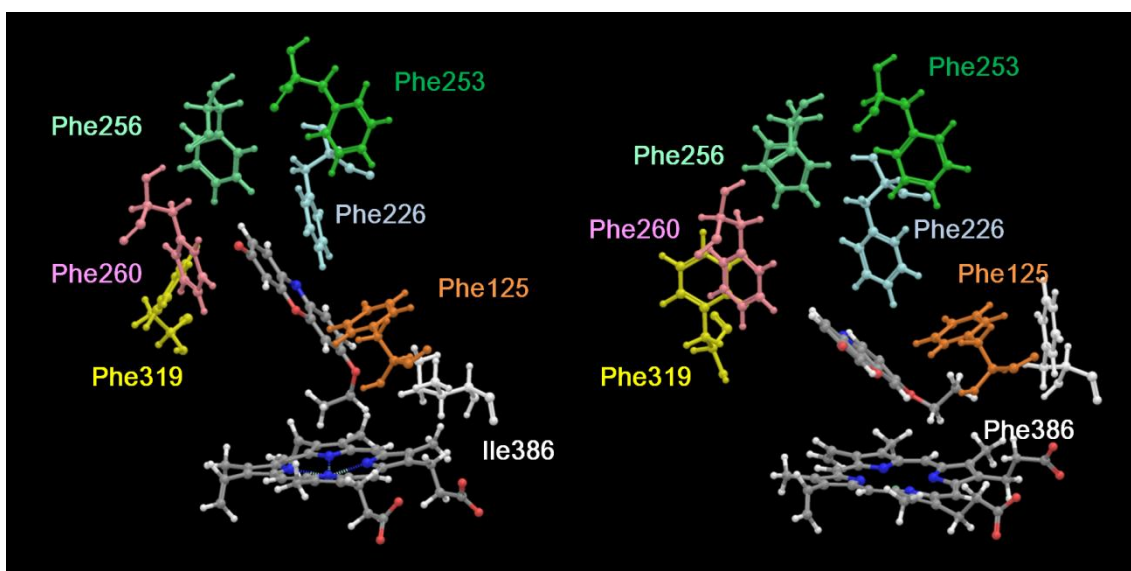


Figure III-5-6. Comparison of the phenylalanines around the active site of CYP1A2.1 complex (left) and CYP1A2.4 complex (right).

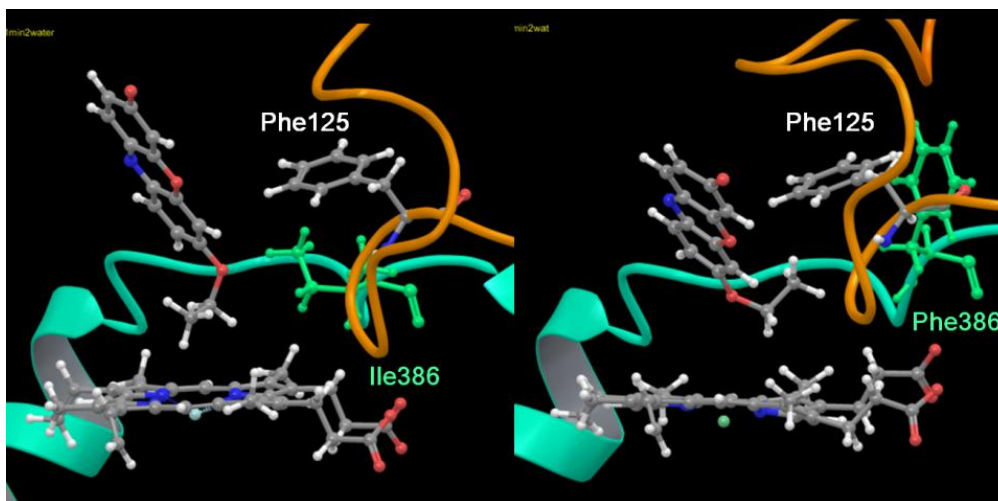


Figure III-5-7. Comparison of the 386th residues and phe125 in CYP1A2.1 complex (left) and CYP1A2.4 complex (right).

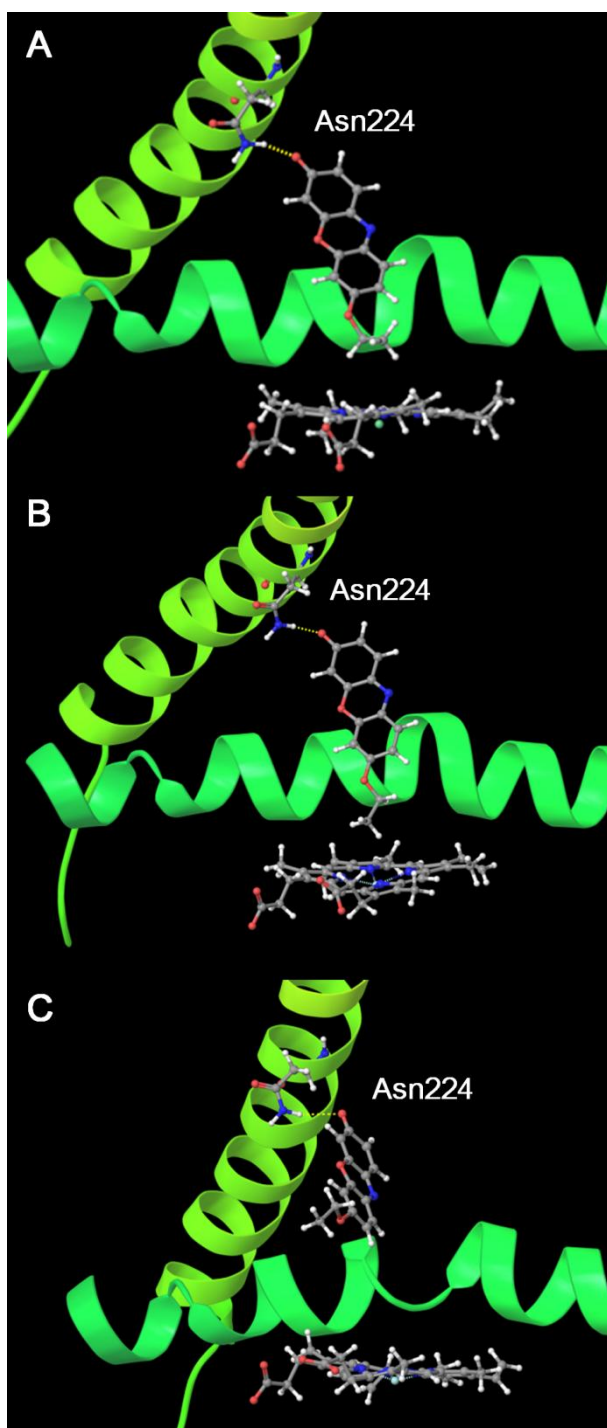


Figure III-5-8. Optimized structure of (A) CYP1A2.6 complex, (B) CYP1A2.15 complex, (C) CYP1A2.16 complex. Residues forming the hydrogen bonds network were shown and labeled.

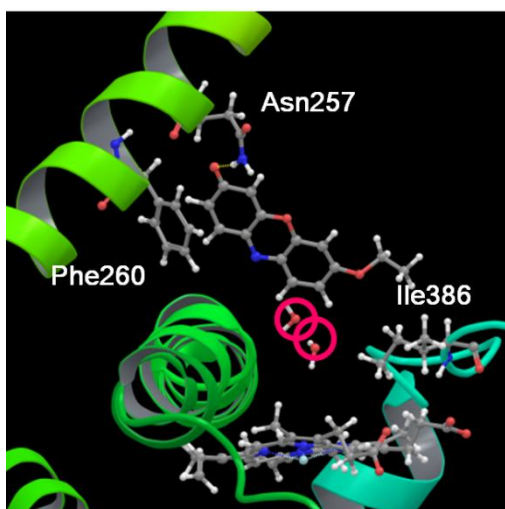


Figure III-5-9. Optimized structure of CYP1A2.16 complex. Water molecules were circled. Residues forming the hydrogen bonds network were shown and labeled.

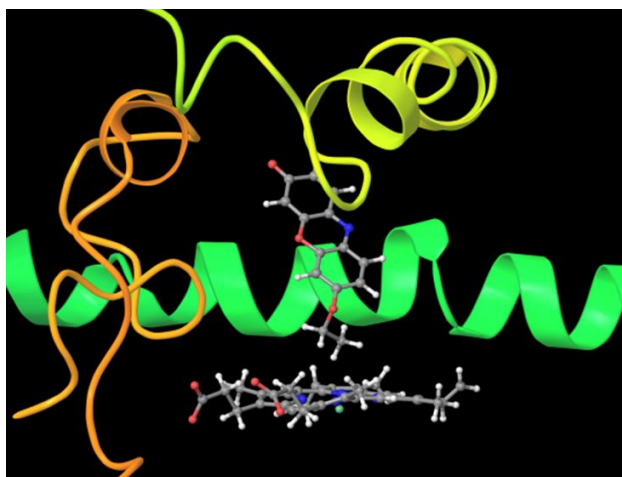


Figure III-5-10. Optimized structure of CYP1A2.8 complex.

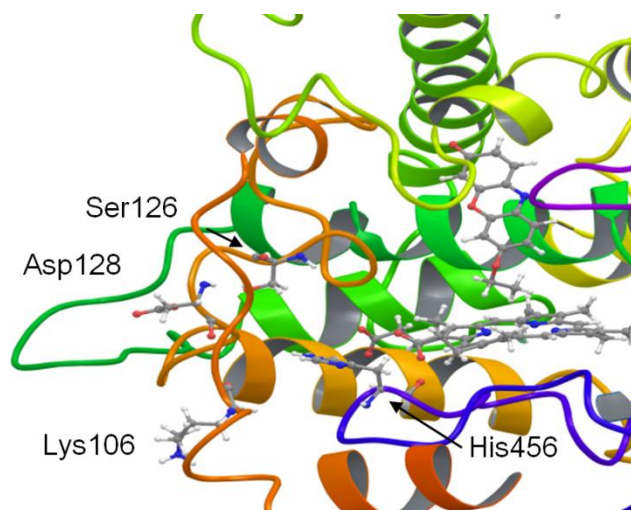


Figure III-5-11. Optimized structure of CYP1A2.8 complex with 7ER. Residues surrounding His456, Lys106, Ser126, and Asp128 were labeled. Hemes, Lignds, and Residues were shown in stick and ball diagram.

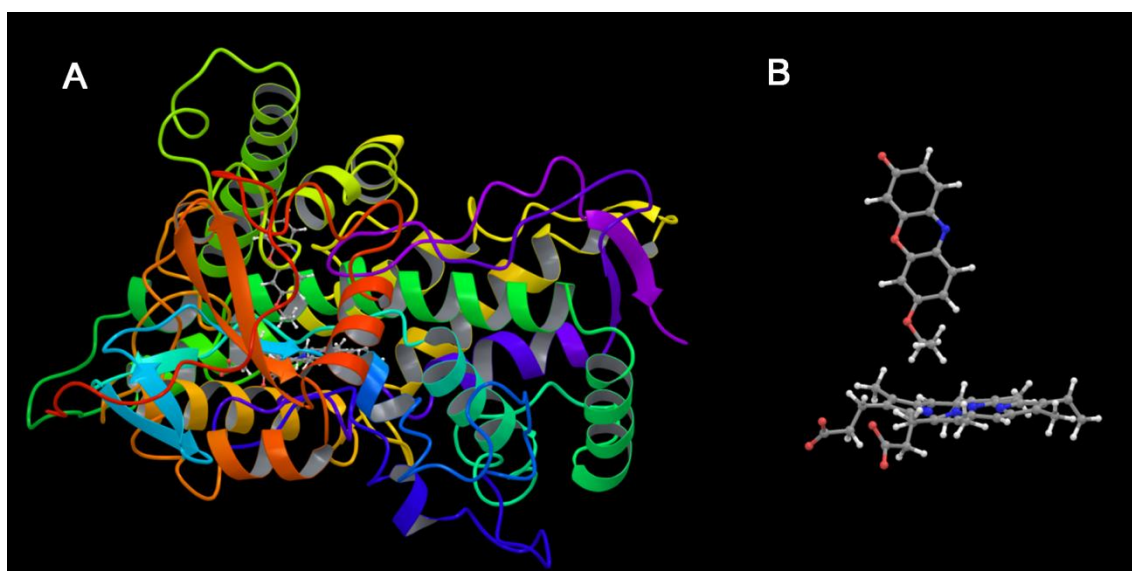


Figure III-5-12. Initial structure of CYP1A2.11 complex obtained after docking. (A) overall structure and (B) the enlarged view of heme and 7ER.

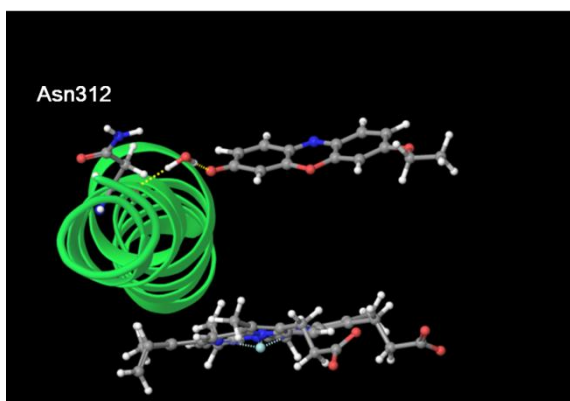


Figure III-5-13. Optimized structure of CYP1A2.11 complex after 100 ns MD simulation.

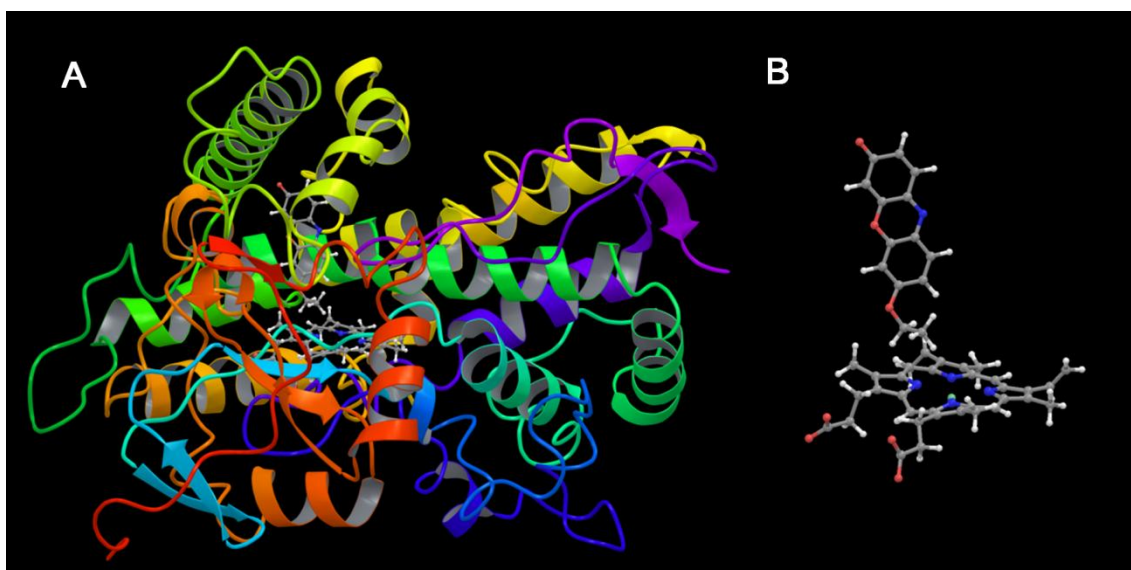


Figure III-5-14. Initial structure of CYP1A2.13 complex obtained after docking. (A) overall structure and (B) the enlarged view of heme and 7ER.

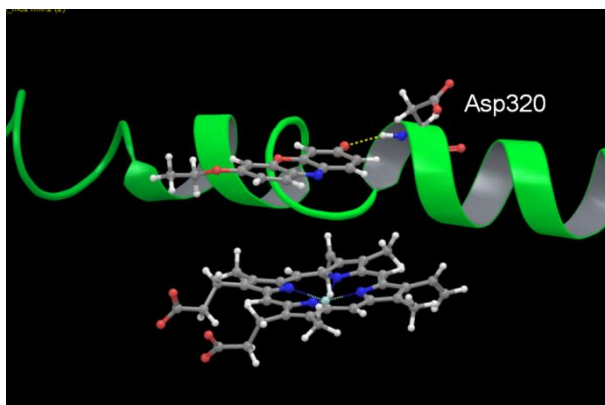


Figure III-5-15. Optimized structure of CYP1A2.13 complex after 100 ns MD simulation.

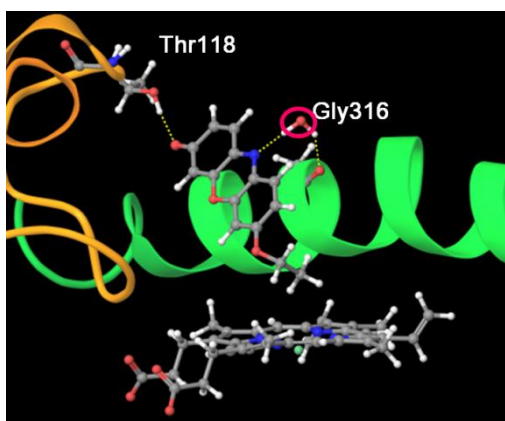


Figure III-5-16. Optimized structure of CYP1A2.14 complex.

III-6. ドッキングと分子動力学シミュレーションによるシトクロム P450 1A2 とフルタミドの複合体構造の予測

III-6-1. 序

前立腺癌治療薬であるフルタミドの薬理活性が十分に発揮されるためには、CYP1A2 による代謝活性化を受ける必要がある。この代謝活性化において、フルタミドはイソプロピル基の炭素に水酸基が導入され、2-ヒドロキシフルタミドとなる。しかし、CYP1A2 とフルタミドとの複合体構造はこれまでに実験的に明らかにされておらず、その代謝活性化のメカニズムは詳細に理解されていない。本節における研究の目的は、CYP1A2 とフルタミドの複合体構造をドッキングにより予測し、CYP1A2 による代謝活性化のメカニズムを詳細に理解することである。CYP1A2 だけでなく、CYP による代謝活性化を受ける薬剤は数多く存在する。例を挙げると、麻薬性鎮痛薬コデイン、抗不安薬ジアゼパム、抗てんかん薬プリミドン、高尿酸血症治療薬アロプリノールがある。本節の研究結果が、CYP による代謝活性化を受ける新規プロドラッグの設計に役立つことが期待される。

III-6-2. 方法

CYP1A2 とフルタミドの複合体構造はドッキングにより作成した。ドッキングの対象としたタンパク質は、第 III-3 節において得られた基質非結合型の CYP1A2 の構造と、第 III-4 節において得られた CYP1A2 と 7ER の複合体構造から選択した。まず、基質非結合型の CYP1A2 の 100 ns の MD トラジェクトリから、5 ns 毎に 21 個の構造を抽出した。さらに、CYP1A2 と 7ER との複合体の 200 ns の MD トラジェクトリから 10 ns 毎に 21 個の構造を抽出した。これらの構造に対し、疎水性空間を HBOP/HBSITE [114,115] により探し出してリガンド結合部位とした。次に、リガンド結合部位に対しドッキングを行い、それぞれの構造に対し 10 個ずつポーズを得た。得られたドッキングポーズのうちフルタミドの酸化部位であるイソプロピル基がヘムに向いており、かつドッキングスコアが最も高いものを複合体の初期構造とした。ドッキングプログラムには GOLD 5.2.2 [116] を用い、それ以外の計算条件は第 III-3 節と同じ条件で行った。

III-6-3. 結果と考察

ドッキングにより作成した、CYP1A2 とフルタミド複合体の初期構造を Figure III-6-1 に示す。この初期構造では、フルタミドのイソプロピル基がヘムに向いており、酵素反応が進行しうると予想された。しかし、この構造を構造最適化し、昇温 MD シミュレーションを行ったところ、フルタミドの構造が反転してしまい、酵素反応が進行しえない複合体構造となっていることがわかった (Figure III-6-2)。Figure III-6-2 の構造において、フルタミドのトリフルオロメチル基がヘムの方に向いており、酸化部位はヘムから最も

遠ざかる構造となっていた。構造最適化と昇温 MD シミュレーションによりこのような構造が得られた原因については、現在検討中である。考えられる可能性としては、フルタミドのドッキング構造に基質が結合するのに適さないタンパク質構造を用いてしまったことが考えられる。MD シミュレーションは一般に、初期構造に大きく依存することが知られている。不適切な複合体構造を初期構造とした場合、ひずみが大きく、そのひずみとその後の構造最適化の過程で初期構造から構造を大きく変化させた原因ではないかと考えられた。このことから、ドッキングにより複合体構造を作成する際には、基質とその周辺残基の相互作用のみで複合体の初期構造を選択するのではなく、複合体構造に適したタンパク質構造を抽出する必要もあると考えられた。複合体構造に適したタンパク質構造を得るためには、まず、基質非結合型の構造と、基質結合型の構造で明確な構造的差異を見出す必要がある。今後、構造変化の影響を考慮してドッキングを行い、複合体構造を作成する予定である。

III-6-4. 結論

本節における研究では、ドッキングにより CYP1A2 とフルタミドの複合体構造の予測を行った。そのドッキングにより予測された複合体構造は酵素反応に矛盾しない構造であったが、その後構造最適化と昇温 MD シミュレーションにより構造変化を起こし、フルタミドの酸化部位がヘムから離れて酵素反応が進行しえない複合体構造となってしまった。このような酵素反応に適さない複合体構造が得られた原因としては、基質が結合するのに適さないタンパク質構造に対しドッキングを行ってしまったことが考えられる。今後は、構造変化を考慮したドッキング手法により複合体構造を作成することを計画している。

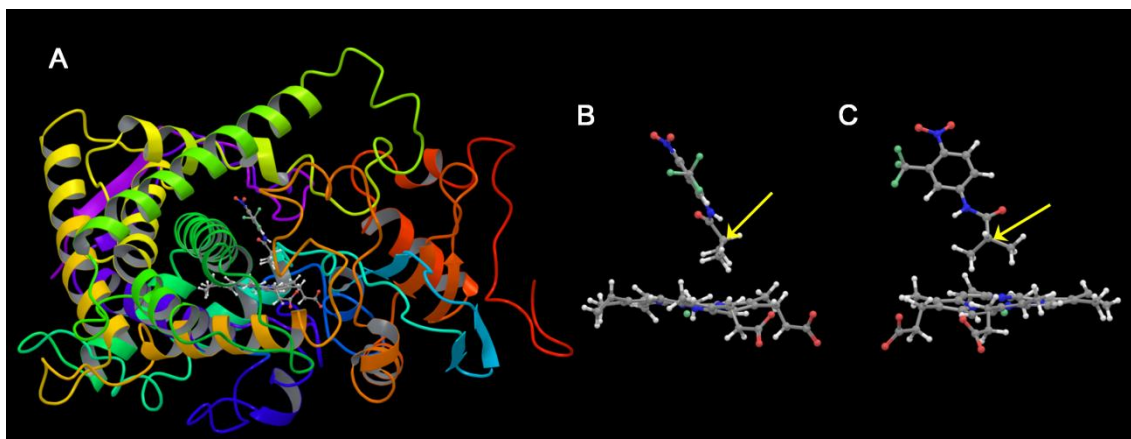


Figure III-6-1. Initial structure of CYP1A2 complex with flutamide obtained after docking. (A) the overall structure, (B) the enlarged view of flutamide and heme, and (C) the enlarged view rotated by 90°.

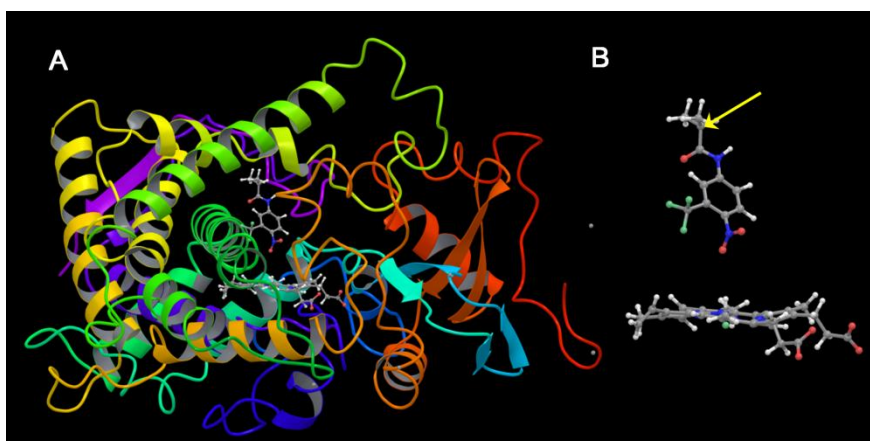


Figure III-6-2. Complex structure CYP1A2 with flutamide obtained after temperature-increasing MD simulation. (A) the overall structure and (B) the enlarged view of flutamide and heme.

IV. 総括

本研究では、フルタミドの活性に影響を及ぼす非酵素的反応・酵素的反応について、それぞれ実験的手法と計算化学的手法により検討した。まず、第 II 章においては、フルタミドの非酵素的反応としてその光反応性に注目し、フルタミドを含む芳香族ニトロ化合物の光反応性について実験的手法により検討した。第 II-2 節においては、フルタミドの光反応性と、副作用の一つである光線過敏症との因果関係について調べた。そこで、フルタミドの光反応性に関わる溶媒効果について検討した。その結果、光線過敏症の原因物質の特定には至らなかったが、フルタミドが多様な光反応を起こし、その中間体であるラジカルが光線過敏症を引き起こす原因となる可能性を示した。また、フルタミドを含む芳香族ニトロ化合物は多様な光反応を示すことが知られているが、フルタミドはニトロ-ニトリト転位を優先的に起こすことが報告されている。そこで、第 II-3 節では、芳香族ニトロ化合物の一つである、2-ニトロベンゾフラン誘導体をモデルとして、ニトロ-ニトリト転位の反応機構について詳細に調べた。これまで、ニトロ-ニトリト転位は芳香族ニトロ化合物のニトロ基と芳香環がなす二面角の角度が大きい場合に起こると考えられていた [24]。しかし、第 II-3 節における研究の結果、ニトロ-ニトリト転位はニトロ基と芳香環が共平面にある場合でも起こりうることを明示的に示した。第 II 章では、フルタミドを含む芳香族ニトロ化合物が高い光反応性を持ち、ラジカル中間体由来する多くの光反応生成物を生じさせることを示すことができた。次に、第 III 章においては、フルタミドの活性に影響を与える酵素的反応として、フルタミドの代謝活性化を行う CYP1A2 に着目し、計算化学的手法によりその立体構造と酵素活性の相関関係について調べた。第 III-3 節においては、アミノ酸置換を伴う遺伝子変異型 CYP1A2 の立体構造を予測し、その酵素活性が野生型と比べ異なる原因について調べた。その結果、遺伝子変異によるアミノ酸置換は、その周辺の立体構造だけでなく離れた領域の立体構造にも影響を及ぼす可能性があることが示された。また、アミノ酸置換は、タンパク質の立体構造だけでなく構造柔軟性にも変化をもたらす可能性が示唆された。次に、第 III-4 節では、CYP1A2 とその阻害剤である ANF との結晶構造において、活性部位に存在した水分子の役割について検討を行った。その結果、CYP1A2 と ANF の複合体構造において、活性部位の水分子は必須ではない可能性が示唆された。加えて、CYP1A2 の基質である 7ER との複合体構造を予測し、CYP1A2 は 7ER の基質認識に水分子を利用している可能性があることを示した。第 III-5 節では、遺伝子変異型 CYP1A2 と 7ER の複合体構造を予測し、第 III-4 節で得られた野生型 CYP1A2 と 7ER との複合体構造との違いを調べた。その結果、いくつかの遺伝子変異型 CYP1A2 では基質認識が野生型とは異なることが示された。しかし、二つの遺伝子変異型 CYP1A2 では、予測された複合体構造が実験結果に対応するものではなかった。さらに、第 III-6 節においてフルタミドをリガンドとして複合体構造の予測を試みたが、酵素反応に矛盾しない複合体構

造を予測することができなかった。これらの結果から、ドッキングの手法の改善が今後の課題として残った。

本研究では、抗癌剤であるフルタミドを対象として、その薬理活性に影響を及ぼす酵素反応・非酵素反応について検討を行った。第 II 章における実験研究で得られた結果は、フルタミドによる光線過敏症の原因物質の特定につながることを期待されるとともに、光に対し安定な芳香族ニトロ化合物を開発する際に有用な情報となることを期待される。第 III 章における計算研究では、薬物代謝酵素の一つである CYP1A2 の生体内環境における三次構造を予測し、基質との複合体構造を得ることができた。そして、CYP1A2 と基質との複合体は活性部位に複数の水分子を含み、その水分子は基質認識において働く可能性があることが示唆された。これらの立体構造や基質認識に関する情報は、今後の CYP を対象としたドラッグデザインの発展に大きく貢献することが期待される。

V. 謝辞

本研究の遂行にあたり、御指導と御鞭撻を賜りました、金沢大学医薬保健研究域薬学系活性相関物理化学研究室、小田彰史准教授に深甚たる謝意を表します。

本研究の遂行にあたり、温かい御指導と御助言を賜りました、金沢大学医薬保健研究域薬学系、福吉修一助教に厚く御礼申し上げます。また、本研究の第 II 章の芳香族ニトロ化合物の光反応について御懇意なる御指導を賜りました、御退職された金沢大学医薬保健研究域薬学系、徳村邦弘准教授に深く御礼申し上げます。

本研究の第 III 章は、東北大学大学院薬学研究科生活習慣病治療薬学分野、平塚真弘准教授、東北大学薬学部、伊藤雅氏による、遺伝子変異型 CYP1A2 の酵素活性に関する報告に基づき解析を行いました。貴重なデータを御呈示頂き、本研究の遂行に惜しみないご協力を賜りましたこと、深く御礼申し上げます。

本研究の第 III-3 節、遺伝子変異型 CYP1A2 の三次構造及び構造柔軟性の予測は、東北薬科大学薬品物理化学教室、高橋央宜准教授、小林佳奈氏によって報告された、分子動力学計算による遺伝子変異型 CYP2B6 の研究を発展させたものです。本研究の遂行に多くのご協力を賜りましたこと、深く御礼申し上げます。同じく、本研究の第 III 章、野生型・遺伝子変異型 CYP1A2 の三次構造予測において多大なる御指導、御助言を賜りました、北里大学薬学部創薬物理化学教室、広野修一教授、山乙教之講師に深く御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、多くの御協力を頂きました活性相関物理化学研究室内の皆様に心より感謝致します。

最後に、終始変わらぬ御指導と御鞭撻を賜りました、金沢大学医薬保健研究域薬学系活性相関物理化学研究室、故中垣良一教授に心より御礼申し上げます。

VI. 参考文献

1. Schellhammer P, Patterson AL, Sharifi R, Sarosdy M, Block N, Vogelzang N, Soloway M, Jones J, Venner P, Kolvenbag G (1995) A controlled trial of bicaltamide versus flutamide, each in combination with luteinizing hormone-releasing hormone analogue therapy, in patients with advanced prostate cancer, *Urology*, 45, 745–752.
2. Ornstein DK, Rao GS, Johnson B, Charlton ET, Andriole GL (1996) Combined finasteride and flutamide therapy in men with advanced prostate cancer, *Urology*, 48, 901–905.
3. Schellhammer PF, Sharifi R, Block NL, Soloway MS, Venner PM, Patterson AL, Sarosdy MF, Vogelzang NJ, Schellenger JJ, Kolvenbag GJCM (1997) Clinical benefits of bicartamide compared with flutamide in combined androgen blockade for patients with advanced prostatic carcinoma: final report of a double-blind, randomized, multicenter trial, *Urology*, 50, 330–336.
4. Shet MS, Mcphaul M, Fisher CW, Stallings NR, Estabrook RW (1997) Metabolism of the antiandrogenic drug (flutamide) by human CYP1A2, *Drug Metab. Dispos.*, 25, 1298–1303.
5. Matsuzaki Y, Nagai D, Ichimura E, Goda R, Tomura A, Doi M (2006) Metabolism and hepatic toxicity of flutamide in cytochrome P450 1A2 knockout SV129 mice, *J. Gastroenterol.*, 41, 231–239.
6. Leroy D, Dompmartin A, Szczurko C (1996) Flutamide photosensitivity, *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.*, 12, 216–218.
7. Vilaplana J, Romaguera C, Azón A, Lecha M (1998) Flutamide photosensitivity – residual vitiliginous lesions, *Contact Dermatitis*, 38, 68–70.
8. Sortino S, Giuffrida S, Guidi GD, Chillimi R, Petralia S, Condorelli G, Sciuto S (2001) The Photochemistry of flutamide and its inclusion complex with β -cyclodextrin. Dramatic effect of the microenvironment on the nature and on the efficiency of the photodegradation pathways, *Photochem. Photobiol.*, 73, 6–13.
9. Sortino S, Marconi G, Condorellia G (2001) New insight on the photoreactivity of the phototoxic anti-cancer flutamide: photochemical pathways selectivity locked and unlocked by structural changes upon drug compartmentalization in phospholipid bilayer vesicles, *Chem. Commun.*, 1226–1227.
10. Sortino S, Marconi G, Petralia S, Condorelli G (2002) Photobinding of flutamide to phospholipid vesicles: Additional evidence for photoprocess unexpectedly triggered by conformational changes in the bilayer, *Helv. Chim. Acta*, 85, 1407–1415.
11. Sortino S, Petralia S, Condorelli G, Marconi G (2003) Direct spectroscopic evidence

that the photochemical outcome of flutamide in a protein environment is turned by modification of the molecular geometry: A comparison with the photobehavior in cyclodextrin and vesicles, *Helv. Chm. Acta*, 86, 266–272.

12. Udagawa C, Fukuyoshi S, Morimoto S, Tanimoto Y, Nakagaki R (2011) Photochemistry of flutamide in various media: Investigation of the reaction mechanism as revealed external magnetic field effects on product yields, *J. Photochem. Photobiol. A*, 226, 57–63.
13. Doepp D, Photochemical reactivity of the nitro group, in: Horspool WM, Song PS (Eds.) *Handbook of Organic Photochemistry and Photobiology*, CRC Press, Boca Raton, Florida, 1995, pp. 1019–1062.
14. Hurley R, Testa AC (1966) Photochemical $n \rightarrow \pi^*$ excitation of nitrobenzene, *J. Am. Chem. Soc.* 88, 4330–4332
15. Finnegan RA, Knutson D (1968) Photochemical studies. VI. Photochemistry of nitrobenzoate esters and related nitroaromatic compounds. Some novel reduction and esterification reactions, *J. Am. Chem. Soc.* 90, 1670–1671
16. Gilbert A, Baggot J, Nitro compounds, in: *Essentials of Molecular Photochemistry*, Blackwell Scientific Publication, Oxford, UK, 1991, pp. 436–456.
17. Mutai K, Kanno S, Kobayashi K (1978) The photo-Smiles rearrangement, *Tetrahedron Lett.*, 15, 1273–1276.
18. Yokoyama K, Nakagaki R, Nakamura J, Mutai K, Nagakura S (1980) Spectroscopic and kinetic study of an intramolecular aromatic nucleophilic photosubstitution mechanism of a photo-Smiles rearrangement, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 53, 2472–2475.
19. Yokoyama K, Nakamura J, Kobayashi T, Nagakura S (1980) Laser induced biphotonic dissociation of nitrobenzene derivatives in solution, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 53, 3474–3477.
20. Nakagaki R, Hiramatsu M, Mutai K, Nagakura S (1985) Photochemistry of bichromophoric chain molecules containing electron donor and acceptor moieties. Dependence of reaction pathways on the chain length and mechanism of photoredox reaction of N-[ω -(p-nitrophenoxy)alkyl]anilines, *Chemical Physics Lett.*, 121, 262–266.
21. Mutai K, Nakagaki R, Tukada H (1985) A rationalization of orientation in nucleophilic aromatic photosubstitution, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 58, 2066–2071.
22. Nakagaki R, Mutai K (1996) Photophysical properties and photosubstitution and photoredox reactions of aromatic nitro compounds, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 69, 261–274.
23. Barltop JA, Bunce NJ (1968) *Organic photochemistry. Part VIII, the photochemical reduction of nitro-compounds*, *J. Chem. Soc.*, 1467–1474.
24. Chapman OL, Heckert DC, Reasoner JW, Thackaberry SP (1966) Photochemical

- studies on 9-nitroanthracene, *J. Am. Chem. Soc.*, 88, 5550–5554.
25. Hamanoue K, Amano M, Kimoto M, Kajiwarra Y, Nakayama T, Teranishi H, (1984) Photochemical reactions of nitroanthracene derivatives in fluid solutions, *J. Am. Chem. Soc.*, 106, 5993–5997.
 26. Plaza-Medina EF, Rodríguez-Córdoba W, Morales-Cueto R, Peon J (2011) Primary photochemistry of nitrated aromatic compounds: Excited-state dynamics and NO dissociation from 9-nitroanthracene, *J. Phys. Chem. A*, 115, 577–585.
 27. James LB, Kudrna C, Foster JP (1969) Photochemically induced reactions of 4-nitroanisole, *Tetrahedron Lett.*, 38, 3263–3265.
 28. He Y, Gahlmann A, Feenstra JS, Park ST, Zewail AH (2006) Ultrafast electron diffraction: Structural dynamics of molecular rearrangement in the NO release from nitrobenzene, *Chem. Asian. J.*, 1, 56–63.
 29. Lippert E, Kelm J (1978) Spektroskopische Untersuchungen über die Rolle des Käfig-Effektes bei der Prädissoziation aromatischer Nitroverbindungen, *Helv. Chim. Acta*, 61, 279–285.
 30. The Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Database (<http://www.cypalleles.ki.se/>)
 31. Nakajima M, Yokoi T, Mizutani M, Kinoshita M, Funayama M, Kamataki T (1999) Genetic polymorphism in the 5'-flanking region of human CYP1A2 gene: effect on the CYP1A2 inducibility in humans, *J. Biochem.*, 125, 803–808.
 32. Sachse C, Brockmöller J, Bauer S, Roots I (1999) Functional significance of a C→A polymorphism in intron 1 of the cytochrome P450 CYP1A2 gene tested with caffeine, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 47, 445–449.
 33. Saito Y, Hanioka N, Maekawa K, Isobe T, Tsuneto Y, Nakamura R, Soyama A, Ozawa S., Tanaka-Kagawa T, Jinno H, Narimatsu S, Sawada J (2005) Functional analysis of three CYP1A2 variants found in a Japanese population. *Drug Metab. Dispos.*, 33, 1905–1910.
 34. Murayama N, Soyama A, Saito Y, Nakajima Y, Komamura K, Ueno K., Kamakura S., Kitakaze M, Kimura H, Goto Y, Saitoh O, Katoh M, Ohnuma T, Kawai M, Sugai K, Ohtsuki T, Suzuki C, Minami N, Ozawa S, Sawada J (2004) Six novel nonsynonymous CYP1A2 gene polymorphisms: catalytic activities of the naturally occurring variant enzymes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 308, 300–306.
 35. Zhou H, Josephya PD, Kimb D, Guengerichb FP (2004) Functional characterization of four allelic variants of human cytochrome P450 1A2. *Arch. Biochem. Biophys.*, 422, 23–30.
 36. Ito M, Katono Y, Oda A, Hirasawa N, Hiratsuka M (2015) Functional characterization

- of 20 allelic variants of CYP1A2. *Drug. Metab. Pharmacokinet.*, 30, 247–252.
37. Sansen S, Yano JK, Reynald RL, Schoch GA, Griffin KJ, Stout CD, Johnson EF (2007) Adaptations for the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons exhibited by the structure of human P450 1A2. *J. Biol. Chem.*, 282, 14348–14355.
 38. Tønnesen HH (2001) Formulation and stability testing of photolabile drugs, *Int. J. Pharm.*, 225, 1–14.
 39. Grinter R, Heilbronner E, Petrzilka T, Seiler P (1968) Photohydrolysis of monosubstituted benzotrifluorides, *Tetrahedron Lett.*, 9, 3845–3848.
 40. Boscá F, Cuquerella MC, Marín ML, Miranda MA (2001) Photochemistry of 2-hydroxy-4-trifluoromethylbenzoic acid, major metabolite of the photosensitizing platelet antiaggregant drug triflusal, *Photochem. Photobiol.*, 73, 463–468.
 41. Chaignon P, Cortial S, Guerineau V, Adeline MT, Giannotti C, Fan G, Ouazzani J (2005) Photochemical reactivity of trifluoromethyl aromatic amines: The example of 3,5-diamino-trifluoromethyl-benzene (3,5-DABTF), *Photochem. Photobiol.*, 81, 1539–1543.
 42. Fasani E, Tilocca F, Albini A (2009) Photochemistry of oxazolidinone antibacterial drugs, *Photochem. Photobiol.*, 85, 879–885.
 43. Atkinson R, Arey J (1994) Atmospheric chemistry of gas-phase polycyclic aromatic hydrocarbons: Formation of atmospheric mutagens, *Environ. Health Perspect.*, 102, 117–126.
 44. Kameda T (2011) Atmospheric chemistry of polycyclic aromatic hydrocarbons and related compounds, *J. Health Sci.*, 57, 504–511.
 45. Hahimoto S, Kano K, Ueda K (1969) Photochemical reduction of 4-nitropyridine. Preparation of 4,4'-azopyridine, *Tetrahedron Lett.*, 32, 2733–2736.
 46. Hunt R, Reid ST (1970) The photorearrangement of 2-nitrofur and 2-nitropyrrole, *J. Chem. Soc. D*, 1576b–1577.
 47. Hunt R, Reid ST (1972) Photochemical transformations. Part VI. The photorearrangement of 2-nitrofur and 2-nitropyrrole, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 2527–2528.
 48. Chapman OL, Cleveland PG, Hoganson ED (1966) A photochemical rearrangement of nitro-olefins, *Chem. Commun. (London)*, 101–102.
 49. Coombes GEA, Grady JM, Reid ST (1967) Photochemical transformations—II. Photochemistry of 6-nitocholesteryl acetate and related compounds, *Tetrahedron*, 23, 1341–1346.
 50. Saito I, Takami M, Matsuura T (1975) Nitro–nitrite rearrangement and intermolecular cycloaddition in the photochemistry of nitro-olefins, *Tetrahedron Lett.* 16, 3155–3158.

51. Kjtaura Y, Matsuura T (1971) Photoinduced reactions—XLVI: Photochemistry of hindered nitrobenzene derivatives, *Tetrahedron*, 27, 1583–1595.
52. Tanemura K, Suzuki T, Nishida Y, Satsumabayashi K, Horaguchi T (2003) A mild and efficient method for the mononitration of aromatic compounds by cerium (III) ammonium nitrate in acetic anhydride, *J. Chem. Research*, 497–499.
53. Aktiengesellschaft B, Oediger H, Braden R, α -Amino-2-hydroxyphenylacetic acids, Ger. Offen. DE 2162717, 1973-06-20.
54. Parker CA (1953) A new sensitive chemical actinometer, I. Some trials with potassium ferrioxalate, *Proc. Roy. Soc. A*, 220, 104–116.
55. Hatchard CG, Parker CA (1956) A new sensitive chemical actinometer, II. Potassium ferrioxalate as a standard chemical actinometer, *Proc. Roy. Soc. A*, 235, 518–536.
56. 広野修一 (2008) イン・シリコ創薬技術に基づく合理的薬剤分子設計, *薬剤学*, 68 (2), 107–115.
57. 神谷成敏, 肥後順一, 福西快文, 中村春木, タンパク質計算科学—基礎と創薬への応用—, 2009 年 8 月, 第一版, 共立出版.
58. 山乙教之, 中込泉, 広野修一 (2006) 超並列コンピュータを活用した Ligand-Based Drug Design, *スーパーコンピューティングニュース*, 8, Special Issue 1, 75–86.
59. Iwase K, Hirono S (1999) Estimation of active conformations of drugs by a new molecular superposing procedure, *J. Comput.-Aided Mol.*, 13, 499–512.
60. Tsujishita H, Hirono S (1997) CAMDAS: an automated conformational analysis system using molecular dynamics. Conformational Analyzer with Molecular Dynamics And Sampling, *J Comput.-Aided Mol.*, 11, 305–315.
61. 平山令明 (2007) 創薬のためのドッキング法, *YAKUGAKU ZASSI*, 127 (1), 133–122.
62. Nelson DR (1999) Cytochrome P450 and the individuality of species, *Arch. Biochem. Biophys.*, 369, 1–10.
63. Nebert DW, Russell DW (2002) Clinical importance of the cytochromes P450, *Lancet*, 360, 1155–1162.
64. Anzenbacher P, Anzenbacherová E (2001) Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics, *Cell Mol. Life. Sci.*, 58, 737–747.
65. Guengerich FP (2008) Cytochrome P450 and chemical toxicology, *Chem. Res. Toxicol.*, 21, 70–83.
66. Williams JA, Hyland R, Jones BC, Smith DA, Hurst S, Goosen TC, Peterkin V, Koup JR, Ball SE (2004) Drug-drug interactions for UDP-glucuronosyltransferase substrates: a pharmacokinetic explanation for typically observed low exposure (AUC_i/AUC) ratios,

Drug. Metab. Dispos., 32, 1201–1208.

67. Evans WE, Relling MV (1999) Pharmacogenomics: Translating functional genomics into rational therapeutics, *Science*, 286, 487–491.
68. Zanger UM, Schwab M (2013) Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation, *Pharmacol. Ther.*, 138, 103–141.
69. Bozina N, Bradamante V, Lovrić M (2009) Genetic polymorphism of metabolic enzymes P450 (CYP) as a susceptibility factor for drug response, toxicity, and cancer risk. *Arh. Hig. Rada. Toksikol.*, 60, 217–242.
70. Nebert DW, Dalton TP, Okey AB, Gonzalez FJ (2004) Role of Aryl Hydrocarbon Receptor-mediated Induction of the CYP1 Enzymes in Environmental Toxicity and Cancer, *J. Biol. Chem.*, 279, 23847–23850.
71. Sesardic D, Boobis AR, Edwards RJ, Davies DS (1988) A form of cytochrome P450 in man, orthologous to form d in the rat, catalyses the O-deethylation of phenacetin and is inducible by cigarette smoking, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 26, 363–372.
72. Poulos TL, Johnson ER, Structures of cytochrome P450 enzymes. In: Ortiz de Montellano PR (Ed.) *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2005, pp. 87–114.
73. Gotoh O (1992) Substrate recognition sites in cytochrome P450 family 2 (CYP2) proteins inferred from comparative analyses of amino acid and coding nucleotide sequences. *J. Biol. Chem.*, 267, 83–90.
74. Hasemann CA, Kurumbail RG, Boddupalli SS, Peterson JA, Deisenhofer J (1995) Structure and function of cytochromes P450: a comparative analysis of three crystal structures, *Structure*, 3, 41–62.
75. Syed K, Mashele SS (2014) Comparative analysis of P450 signature motifs EXXR and CXG in the large and diverse kingdom of fungi: identification of evolutionarily conserved amino acid patterns characteristic of P450 family. *PLoS One*, 9, e95616.
76. Kemper B (2004) Structural basis for the role in protein folding of conserved proline-rich regions in cytochromes P450. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 199, 305–315.
77. Scott EE, He YA, Wester MR, White MA, Chin CC, Halpert JR, Johnson EF, Stout CD (2003) An open conformation of mammalian cytochrome P450 2B4 at 1.6-Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 100, 13196–13201.
78. Scott EE, White MA, He YA, Johnson EF, Stout CD, Halpert JR (2004) Structure of mammalian cytochrome P450 2B4 complexed with 4-(4-chlorophenyl)imidazole at 1.9-Å resolution: insight into the range of P450 conformations and the coordination of redox partner binding. *J. Biol. Chem.*, 279, 27294–27301.

79. Zhao Y, White MA, Muralidhara BK, Sun L, Halpert JR, Stout CD (2006) Structure of microsomal cytochrome P450 2B4 complexed with the antifungal drug bifonazole. Insight into P450 conformational plasticity and membrane interaction. *J. Biol. Chem.*, 281, 5973–5981.
80. Muralidhara BK, Negi S, Chin CC, Braun W, Halpert JR (2006) Conformational flexibility of mammalian cytochrome P450 2B4 in binding imidazole inhibitors with different ring chemistry and side chains. Solution thermodynamics and molecular modeling. *J. Biol. Chem.*, 281, 8051–8061.
81. Ekroos M, Sjögren T (2006) Structural basis for ligand promiscuity in cytochrome P 450 3A4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 103, 13682–13687.
82. Xu LH, Fushinobu S, Ikeda H, Wakagi T, Shoun H (2009) Crystal structures of cytochrome P450 105P1 from *Streptomyces avermitilis*: conformational flexibility and histidine ligation state. *J. Bacteriol.*, 191, 1211–1219.
83. Savino C, Montemiglio LC, Sciara G, Miele AE, Kendrew SG, Jemth P, Gianni S, Vallone B (2009) Investigating the Structural Plasticity of a Cytochrome P450. Three-dimensional structures of P450 EryK and binding to its physiological substrate. *J. Biol. Chem.*, 284, 29170–29179.
84. Montemiglio LC, Gianni S, Vallone B, Savino C (2010) Azole drugs trap cytochrome P450 EryK in alternative conformational states. *Biochemistry*, 49, 9199–9206.
85. Lee YT, Wilson RF, Rupniewski I, Goodin DB (2010) P450cam visits an open conformation in the absence of substrate. *Biochemistry*, 49, 3412–3419.
86. Groves JT, Models and mechanisms of cytochrome P450 action. In: Ortiz de Montellano PR (Ed.) *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2005, pp.1–43.
87. Krest CM, Onderko EL, Yosca TH, Calixto JC, Karp RF, Livada J, Rittle J, Green MT (2013) Reactive intermediates in cytochrome p450 catalysis. *J. Biol. Chem.*, 288, 17074–17081.
88. 大村恒雄, 石村 巽, 藤井 義明, P450 の分子生物学, 2009 年, 第二版, 講談社.
89. Chang YT, Stiffelman OB, Vakser IA, Loew GH, Bridges A, Waskell L (1997) Construction of a 3D model of cytochrome P450 2B4. *Protein Eng.*, 10, 119–129.
90. Bridges A, Gruenke L, Chang YT, Vakser IA, Loew G, Waskell L (1998) Identification of the binding site on cytochrome P450 2B4 for cytochrome b5 and cytochrome P450 reductase. *J. Biol. Chem.*, 273, 17036–17049.
91. Hamdane D, Xia C, Im SC, Zhang H, Kim JJ, Waskell L (2009) Structure and function of an NADPH-Cytochrome P450 oxidoreductase in an open conformation capable of reducing cytochrome P450. *J. Biol. Chem.*, 284, 11374–11384.

92. Shimizu T, Tateishi T, Hatano M, Fujii-Kuriyama Y (1991) Probing the role of lysines and arginines in the catalytic function of cytochrome P450d by site-directed mutagenesis. Interaction with NADPH-cytochrome P450 reductase. *J. Biol. Chem.*, 266, 3372–3375.
93. Haines DC, Tomchick DR, Machius M, Peterson JA (2001) Pivotal role of water in the mechanism of P450BM-3. *Biochemistry*, 40, 13456–13465.
94. Schlichting I, Berendzen, Chu K, Stock AM, Maves SA, Benson DE, Sweet RM, Ringe D, Petsko GA, Sligar SG (2000) The catalytic pathway of cytochrome p450cam at atomic resolution. *Science*, 287, 1615–1622.
95. Prasad B, Mah DJ, Lewis AR, Plettner E (2013) Water oxidation by a cytochrome p450: mechanism and function of the reaction. *PLoS One*, 25, e61897.
96. Oda A, Yamaotsu N, Hirono S (2004) Studies of binding modes of (S)-mephenytoin to wild types and mutants of cytochrome P450 2C19 and 2C9 using homology modeling and computational docking. *Pharm. Res.*, 21, 2270–2278.
97. Kobayashi K, Takahashi O, Hiratsuka M, Yamaotsu N, Hirono S, Watanabe Y, Oda A (2014) Evaluation of influence of single nucleotide polymorphisms in cytochrome P450 2B6 on substrate recognition using computational docking and molecular dynamics simulation. *PLOS ONE*, 9, e96789.
98. Zhang T, Liu LA, Lewis DFV, Wei DQ (2011) Long-range effects of a peripheral mutation on the enzymatic activity of cytochrome P450 1A2. *J. Chem. Inf. Model.*, 51, 1336–1346.
99. Ma LN, Du ZZ, Lian P, Wei DQ (2014) A theoretical study on the mechanism of a superficial mutation inhibiting the enzymatic activity of CYP1A2. *Interdiscip. Sci.*, 6, 25–31.
100. Sano E, Li W, Yuki H, Liu X, Furihata T, Kobayashi K, Chiba K, Neya S, Hoshino T (2010) Mechanism of the decrease in catalytic activity of human cytochrome P450 2C9 polymorphic variants investigated by computational analysis. *J. Comput. Chem.*, 31, 2746–2758.
101. de Waal PW, Sunden KF, Furge LL (2014) Molecular dynamics of CYP2D6 polymorphisms in the absence and presence of a mechanism-based inactivator reveals changes in local flexibility and dominant substrate access channels. *PLOS ONE*. 9, e108607.
102. Tu Y, Deshmukh R, Sivaneri M, Szklarz GD (2008) Application of molecular modeling for prediction of substrate specificity in cytochrome P450 1A2 mutants. *Drug. Metab. Dispos.*, 36, 2371–2380.
103. Huang Q, Szklarz GD (2010) Significant increase in phenacetin oxidation on L382V

- substitution in human cytochrome P450 1A2. *Drug. Metab. Dispos.*, 38, 1039–1045.
104. Liu J, Ericksen SS, Sivaneri M, Besspiata D, Fisher CW, Szklarz GD (2004) The effect of reciprocal active site mutations in human cytochromes P450 1A1 and 1A2 on alkoxyresorufin metabolism. *Arch. Biochem. Biophys.*, 424, 33–43.
 105. Skopalík J, Anzenbacher P, Otyepka M (2008) Flexibility of human Cytochromes P450: Molecular dynamics reveals differences between CYPs 3A4, 2C9, and 2A6, which correlate with their substrate preferences. *J. Phys. Chem. B.*, 112, 8165–8173.
 106. Sun H, Scott DO (2010) Structure-based drug metabolism predictions for drug design. *Chem. Biol. Drug. Des.*, 75, 3–17.
 107. de Groot MJ (2006) Designing better drugs: predicting cytochrome P450 metabolism. *Drug Discov. Today*, 11, 601–606.
 108. Oda A, Yamaotsu N, Hirono S (2005) New AMBER force field parameters of heme iron for cytochrome P450s determined by quantum chemical calculations of simplified models. *J. Comput. Chem.*, 26, 818–826.
 109. Case DA, Darden TA, Cheatham TE 3rd, Simmerling CL, Wang J, Duke RE, Luo R, Walker RC, Zhang W, Merz KM, Roberts B, Hayik S, Roitberg A, Seabra G, Swails J, Götz AW, Kolossváry I, Wong KF, Paesani F, Vanicek J, Wolf RM., Liu J, Wu X, Brozell SR, Steinbrecher T, Gohlke H, Cai Q, Ye X, Wang J, Hsieh MJ, Cui G, Roe DR, Mathews DH, Seetin MG, Salomon-Ferrer R, Sagui C, Babin V, Luchko T, Gusarov S, Kovalenko A, Kollman PA (2012) AMBER12, San Francisco, University of California.
 110. Cojocaru V, Winn PJ, Wade RC (2007) The ins and outs of cytochrome P450s. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1770, 390–401.
 111. Kumar D, Altun A, Shaik S, Thiel W (2011) Water as biocatalyst in cytochrome P450. *Faraday Discuss*, 148, 373–383.
 112. Shaik S, Kumar D, de Visser SP, Altun A, Thiel W (2005) Theoretical Perspective on the Structure and Mechanism of Cytochrome P450 Enzymes. *Chem Rev.*, 105, 2279–2328.
 113. Thellamurege N, Hirao H (2013) Water complexes of cytochrome P450: insights from energy decomposition analysis. *Molecules*, 18: 6782–6791.
 114. Yamaotsu N, Oda A, Hirono S (2008) Determination of ligand-binding sites on proteins using long-range hydrophobic potential. *Biol. Pharm. Bull.*, 31, 1552–15528.
 115. Oda A, Yamaotsu N, Hirono (2009) S. Evaluation of the searching abilities of HBOP and HBSITE for binding pocket detection. *J. Comput. Chem.*, 30, 2728–2737.
 116. Verdonk ML, Cole JC, Hartshorn MJ, Murray CW, Taylor RD (2003) Improved Protein-Ligand Docking Using GOLD. *Proteins*, 52, 609–623.

VII. 論文目録

主論文

本学位論文の内容は、下記発表論文を基礎とする

Yurie Watanabe, Shuichi Fukuyoshi, Akifumi Oda (2015) Comparison of photoreactions of flutamide in acetonitrile and 2-propanol solvents in the absence of cage-forming compounds, *J. Photochem. Photobiol. A*, 298, 55–61.

Yurie Watanabe[†], Tomohiro Tanaka[†], Shuichi Fukuyoshi, Akifumi Oda (2015) Investigation of photoreaction for 2-nitrobenzofuran and its 3-methyl derivative, *J. Photochem. Photobiol. A*, 311, 137–143. ([†]equal contribution)

副論文

Yurie Watanabe, Shuichi Fukuyoshi, Akifumi Oda, Ryoichi Nakagaki (2013) Crystal Structure of N-[4-Hydroxy-3-nitro-5-(trifluoromethyl)phenyl]-2-methylpropanamide, *X-ray Struct. Anal. Online*, 29, 35–36.

Kana Kobayashi, Ohgi Takahashi, Masahiro Hiratsuka, Noriyuki Yamaotsu, Shuichi Hirono, Yurie Watanabe, Akifumi Oda (2014) Evaluation of influence of single nucleotide polymorphisms in cytochrome P450 2B6 on substrate recognition using computational docking and molecular dynamics simulation, *PLOS ONE*, 9, e96789.

Akifumi Oda, Ken Saijo, Chikashi Ishioka, Koichi Narita, Tadashi Katoh, Yurie Watanabe, Shuichi Fukuyoshi, Ohgi Takahashi (2014) Predicting the structures of complexes between phosphoinositide 3-kinase (PI3K) and romidepsin-related compounds for the drug design of PI3K/histone deacetylase dual inhibitors using computational docking and the ligand-based drug design approach, *J. Mol. Graph. Model.*, 54, 46–53.

Akifumi Oda, Noriyuki Yamaotsu, Shuichi Hirono, Yurie Watanabe, Shuichi Fukuyoshi, Ohgi Takahashi (2015) Effects of initial settings on computational protein-ligand docking accuracies for several docking programs, *Mol. Simul.* 41, 1027–1034.